

Anwendung der Mikrodialyse für die proteomische
Probenvorbehandlung:

Entfernung von Triton X-100 sowie

Testung automatisierbarer Mikrodialysatoren-Prototypen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Franziska Hanika

geboren am 04.01.1991 in Sömmerda

Gutachter

- 1. PD Dr. med. Heidrun Rhode, Jena**
- 2. PD Dr. rer. nat. Frank T. Peters, Jena**
- 3. Prof. Dr. rer. nat. Ewald Hannappel, Erlangen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung	S. 6
2. Einleitung	
2.1. Proteomics	S. 8
2.2. Detergenzien	S. 9
2.3. Aufbau von Detergenzien	S. 9
2.4. Wirkspektrum von Detergenzien	S. 11
2.5. Bildung von Mizellen	S. 11
2.6. Detergenzien in der Biochemie	S. 14
2.7. Triton X-100	S. 15
2.8. Entfernung von Detergenzien	S. 15
2.9. Dialyse	S. 17
2.10. MD-100	S. 19
2.11. Neu entwickelte Mikrodialysator-Prototypen	S. 20
3. Aufgabenstellung	
3.1. Suche nach Möglichkeiten zur Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse	S. 21
3.2. Testen neuer prototypischer Mikrodialysatoren	S. 21
4. Materialien und Geräte	
4.1. Materialien	S. 22
4.2. Geräte	S. 23
5. Methoden	
5.1. Möglichkeiten zur Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse	
5.1.1. Bestimmung der CMC	S. 24
5.1.2. Möglichkeiten der CMC-Verschiebung	S. 25
5.1.3. Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse in Anwesenheit von Additiven	S. 26
5.1.4. Temperaturabhängigkeit der Dialyseeffizienz	S. 26
5.1.5. Proteinbestimmung	S. 27
5.1.5.1. Einfluss von Triton X-100 auf die Proteinbestimmung	S. 27

5.1.6.	Testung der Stabilität der fluoreszierenden Phycobilinproteine	S. 27
5.1.7.	Entfernung von Triton X-100 aus R- Phycoerythrin-haltigen Lösungen mittels Dialyse	S. 28
5.2.	Testung der Proteinwiederfindung beim Rückgewinnen der Proben aus MD-100	S. 28
5.3.	Testung neu entwickelter Mikrodialysator-Prototypen	
5.3.1.	Probenwiederfindung	S. 29
5.3.2.	Parallelisierbarkeit der neu entwickelten Mikrodialysator- Prototypen	S. 30
4.3.3.	Vergleich der Dialysegeschwindigkeiten von p-Nitrophenol mit MD- 100 und den neuen Mikrodialysatorprototypen	S. 30
6. Ergebnisse		
6.1.	Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse	
6.1.1.	CMC von Triton X-100 in Puffer A	S. 32
6.1.2.	CMC von Triton X-100 in Puffer A bei Anwesenheit von verschiedenen Additiven	S. 32
6.1.3.	Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse in Anwesenheit von verschiedenen Additiven	S. 48
6.1.4.	Einfluss der Temperatur auf die Dialyse	S. 56
6.1.5.	Proteinwiederfindung	S. 57
6.1.6.	Stabilität der Phycobilin-Fluoreszenz	S. 57
6.1.7.	Dialyse von Triton X-100 in Anwesenheit von R-Phycoerythrin	S. 58
6.2.	Testung neu entwickelter Mikrodialysator-Prototypen	
6.2.1.	Proteinwiederfindung	S. 60
6.2.2.	Vergleich MD-100-neu entwickelte Mikrodialysator-Prototypen	S. 62
7. Diskussion		
7.1.	Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse	S. 64
7.1.1.	CMC-Erhöhung	S. 64
7.1.2.	Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse	S. 65
7.1.3.	Temperaturabhängigkeit der Dialyse	S. 66
7.1.4.	Dialyse von Triton X-100 mit R-Phycoerythrin	S. 66
7.2.	MD-100	S. 67

7.3. Neu entwickelte Mikrodialysator-Prototypen	
7.3.1. Wiederfindung aus neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen	S. 68
7.3.2. Vergleich von MD-100 und neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen	S. 68
8. Schlussfolgerungen	S. 70
9. Literaturverzeichnis	S. 71
10. Anhang	S. 77

Abkürzungsverzeichnis

BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CMC	critical micellar concentration
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
2D	2-Dimensional
3D	3-Dimensional
EtOH	Ethanol
GHC	Guanidinhydrochlorid
HCl	Salzsäure
NaCl	Natriumchlorid
MeOH	Methanol
Min	Minute
N	Anzahl der Werte
NaN ₃	Natriumazid
Na ₃ PO ₄	Trinatriumphosphat
Na-Thio	Natriumthiocyanat
LM	Lösungsmittel
2-Prop	2- Propanol
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEA	Triethanolamin
TRIS	Tri(hydroxymethyl)methylamin
UV	Ultraviolett

1. Zusammenfassung

Im Rahmen der Proteomanalyse werden verschiedene Detergenzien zur Extraktion, Solubilisierung bzw. Denaturierung von Proteinen verwendet. Ein sehr häufig verwendetes Detergens ist Triton X-100.

Allerdings können Detergenzien, so auch Triton X-100, die nachfolgende Chromatographie und Massenspektrometrie stören. Deshalb müssen Detergenzien vor den Analysen aus den zu untersuchenden Proben effizient entfernt werden. Für den Mediumwechsel und die Entfernung störender Substanzen bei Hochdurchsatzanwendungen kann die Mikrodialyse eine wertvolle methodische Bereicherung sein. Sie ist per se jedoch nicht zur Entfernung von Triton X-100 geeignet, da dieses Detergens in physiologischen Medien immer in großen Mizellen mit hohen Aggregationszahlen vorliegt.

Als Erstes wurde untersucht, inwieweit verschiedene Additive zu einer CMC-Erhöhung führen und ob dies die Detergensentfernung erleichtert. Diejenigen Zusätze, die zu einer Erhöhung der CMC von Triton X-100 führten, wurden hinsichtlich ihres Effektes auf die Dialysierbarkeit dieses Detergens untersucht.

2-Propanol, Kombinationen aus DMSO und Ethanol sowie Harnstoff und 2-Propanol führten zu einer CMC-Erhöhung auf das 17-fache. Mit diesen Additiven kann Triton X-100 praktisch vollständig aus einer Probe (ohne und mit Proteinen) entfernt werden.

Für die Dialyse stehen jetzt nicht nur MD-100, sondern nun auch prototypische konische Mikrodialysatoren mit einer zusätzlichen Kapillare sowie einer, für jegliche Pipettenspitzen verwendbare Gummidichtung zur Verfügung, welche im Bereich von 10-600 µl Füllvolumen verwendet werden können.

Diese neuen Mikrodialysator-Prototypen erzielten bezüglich der Probenrückgewinnung bessere Ergebnisse und waren hinsichtlich der Dialysegeschwindigkeit vergleichbar.

Es muss nun bei Erhalt der geometrischen Charakteristika eine serienmäßig produzierbare Form entwickelt und geprüft werden.

2. Einleitung

2.1. Proteomics

Proteomics ist ein Forschungsgebiet, mit dessen Hilfe alle Proteine einer Zelle oder eines Gewebes zu einem definierten Zeitpunkt erfasst werden sollen. Die Gesamtheit aller Proteine bezeichnet man als Proteom. "The word proteome was first introduced in July 1995 and was defined as the total protein complement of a genome" (Wasinger et al. 1995). Das Proteom unterliegt im Gegensatz zum Genom fortwährenden Veränderungen. Diese Dynamik bezieht sich auf Konzentration, Zusammensetzung, Modifikation und Funktionsweise des Proteoms. So haben beispielsweise Raupe und Schmetterling das gleiche Genom, aber die verschiedenen Phänotypen beider werden durch das Proteom bestimmt. Aufgrund unterschiedlicher Konzentration und Zusammensetzung eines Proteoms kann man Rückschlüsse auf den Zustand der vorliegenden Zellen beziehungsweise Gewebe ziehen. Demzufolge sind die Ziele in der Medizin klar definiert: Erforschung von Proteinen, deren Konzentrationsanstieg oder -abfall mit Krankheiten assoziiert ist. Solche Veränderungen könnten zukünftig Biomarker bei der Diagnostik einer bestimmten Erkrankung werden, aber auch grundlegende Informationen zur Pathogenese und damit zur Entwicklung eines entsprechenden Therapeutikums für diese Erkrankung bereitstellen. Dazu dient auch die Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die Analyse der Proteinexpression, Quantifizierung von Proteinen sowie die Ermittlung der 3D-Raumstruktur von Proteinmolekülen (Scharnagl et al. 2008).

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von biologischen Einheiten und der für Proteom-Untersuchungen erforderlichen Massenspektrometrie ist eine Reihe von Arbeitsschritten zur Probenvorbereitung notwendig. Da massenspektrometrisch immer nur wenige Analyte gemessen werden können, muss das Proteom fraktioniert werden. Das kann entweder auf der Ebene der Proteine oder der Peptide erfolgen (Rabilloud and Lelong 2011). Nach der Proteintrennung folgt der Proteaseverdau, die Trennung der erzeugten tryptischen Peptide und schließlich die massenspektrometrische Identifikation und Quantifizierung der Proteine anhand der

Peptide. Zur Proteintrennung können verschiedene Verfahren wie Chromatografie, Kapillarelektrophorese und 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden.

Die massenspektrometrischen Methoden sind beispielsweise Peptide Mass Fingerprint (Sommerer et al. 2007) oder Tandem Massenspektrometrie (Vogesser 2004). Durch einen Datenbankabgleich kann das Masse-/Ladungsverhältnis der Peptide Proteinen zugeordnet werden (Schramm et al. 2003).

2.2. Detergenzien

Detergenzien sind amphiphile Stoffe, die einen hydrophilen (polaren) und einen hydrophoben (unpolaren) Anteil besitzen. Dadurch können die polaren Gruppen mit Wassermolekülen wechselwirken, während sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten untereinander oder mit anderen hydrophoben Molekülen zusammenlagern.

2.3. Aufbau von Detergenzien

Der unpolare Anteil besteht meist aus einer Alkyl- oder Alkylbenzolgruppe. Je nach Art des polaren Teils unterscheidet man zwischen nicht-ionischen Tensiden mit Alkohol- bzw. Ethergruppe oder einer Kombination aus beiden, anionischen Tensiden mit einer Carboxylat-, Sulfat- oder Sulfonatgruppe, kationischen Tensiden mit einer quartären Ammoniumgruppe und zwitterionischen Tensiden mit einer Mischung aus einer Carboxylat- und einer quartären Ammoniumgruppe (Abb. 1).

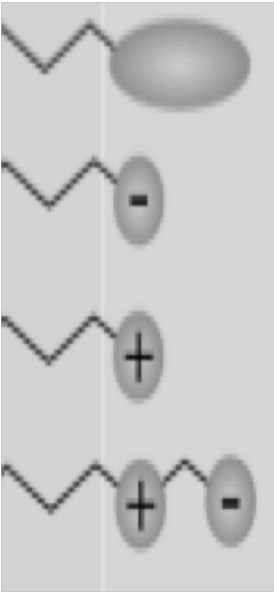
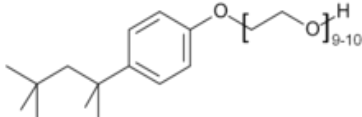

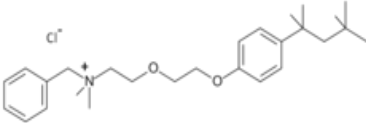

Detergenzklasse		Beispiel	
Strukturschema	Name	Struktur	Name
	Nichtionische Detergenzien		Triton X-100
	Anionische Detergenzien		Natrium-dodecylsulfat (SDS)
	Kationische Detergenzien		Benzethonium-chlorid
	Zwitterionische Detergenzien		Sulfobetain SB 12

Abb. 1: Übersicht über die verschiedenen Tensidklassen

Die Struktur des Detergens, d.h. die Art, die Größe sowie die Gestalt der polaren und apolaren Gruppen, aber auch die Eigenschaften des Lösungsmittels beeinflussen die Löslichkeit und die CMC dieser Moleküle (Łuczak et al. 2008), siehe 2.5.

2.4. Wirkungsspektrum von Detergenzien

Detergenzien (vom Lateinischen *detergere*: „abwischen“) ermöglichen eine homogene Mischung von ansonsten nicht ineinander löslichen Substanzen, beispielsweise Öle, Fette oder hydrophobe Proteine und Wasser. Sie vermindern außerdem die Oberflächenspannung von Wasser. Daher werden sie auch als Tenside bezeichnet.

Bei der Solubilisierung von Membranproteinen oder Proteinkomplexen werden die hydrophoben Bereiche des Proteins von Detergenzmolekülen umhüllt und maskiert. Dadurch wird die Aggregation dieser Proteine in wässrigen Lösungen minimiert und durch die Interaktion mit Wasser verbessert.

2.5. Bildung von Mizellen

Die hydrophoben Anteile von Detergenzien können nicht nur mit anderen hydrophoben Verbindungen reagieren und sie dadurch wasserlöslich machen (Seddon et al. 2004), sondern auch untereinander. Bei niedrigen Konzentrationen liegen die Detergenzmoleküle als gelöste Monomere vor. Die Oberflächenspannung einer wässrigen Lösung sinkt mit zunehmender Konzentration des Detergens in diesem Konzentrationsbereich. Ab einer bestimmten Konzentration, der CMC (critical micelar concentration), bilden Detergenzien in wässrigen Lösungen Mizellen (Abb. 2). Das sind Aggregate, bei denen sich die hydrophoben Enden in der Mizellenmitte vereinigen und die hydrophilen in Richtung des Wassers zeigen.

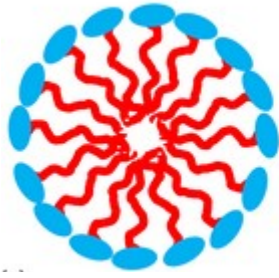


Abb. 2: Aufbau einer Kugelmizelle. Die wasserabstoßenden aliphatischen Reste lagern sich in der Mizellenmitte zusammen, während die wasserliebenden Anteile die Oberfläche der Mizelle bedecken (Cotanda et al. 2012).

Bei über die CMC steigenden Konzentrationen erhöht sich die Mizellenkonzentration, wobei die Konzentration der freien Monomere und damit die Oberflächenspannung konstant bleiben. Die Mizellen bilden dabei eine eigene Phase (Mikrophase), welche im Gleichgewicht mit den Monomeren sowie mit Komplexen aus Proteinen steht. Das bedeutet, dass es sich um ein dynamisches Gleichgewicht handelt, in dem sich sowohl Mizellen auflösen und die Monomere abgeben, als auch neue Mizellen, Komplexe und Grenzschichten ausgebildet werden (Abb. 3).

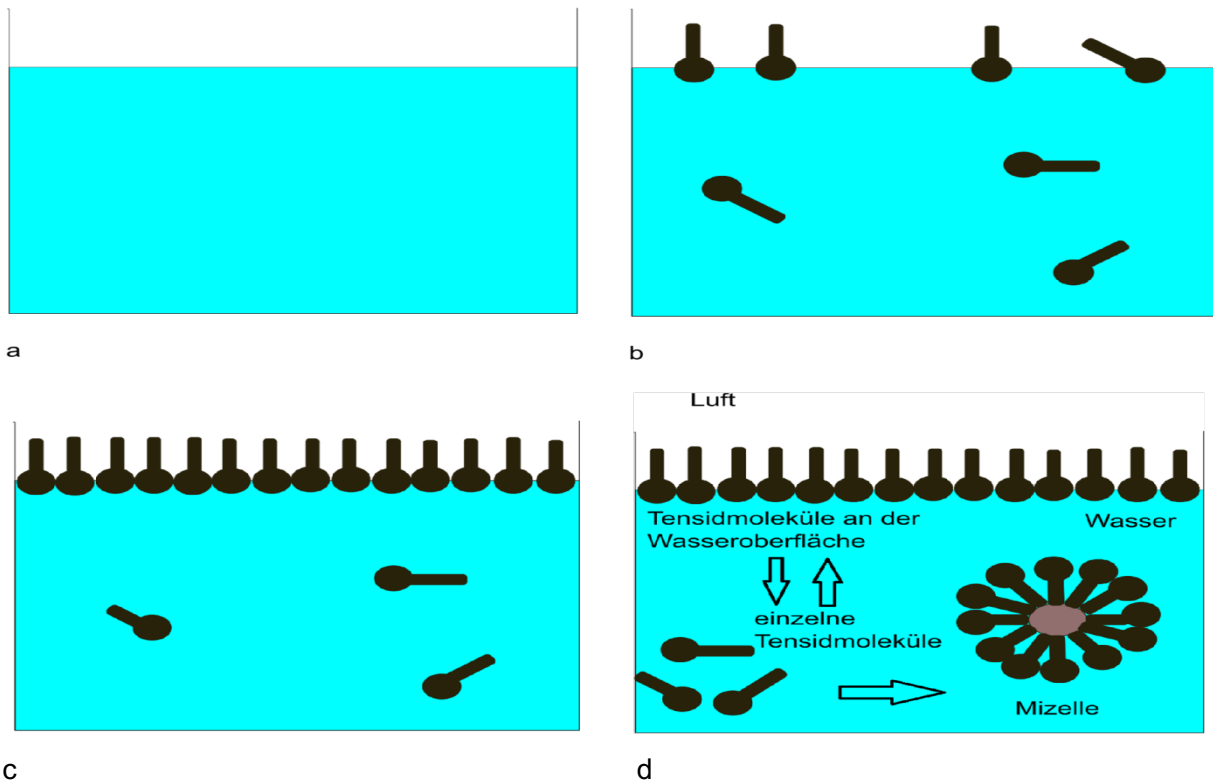
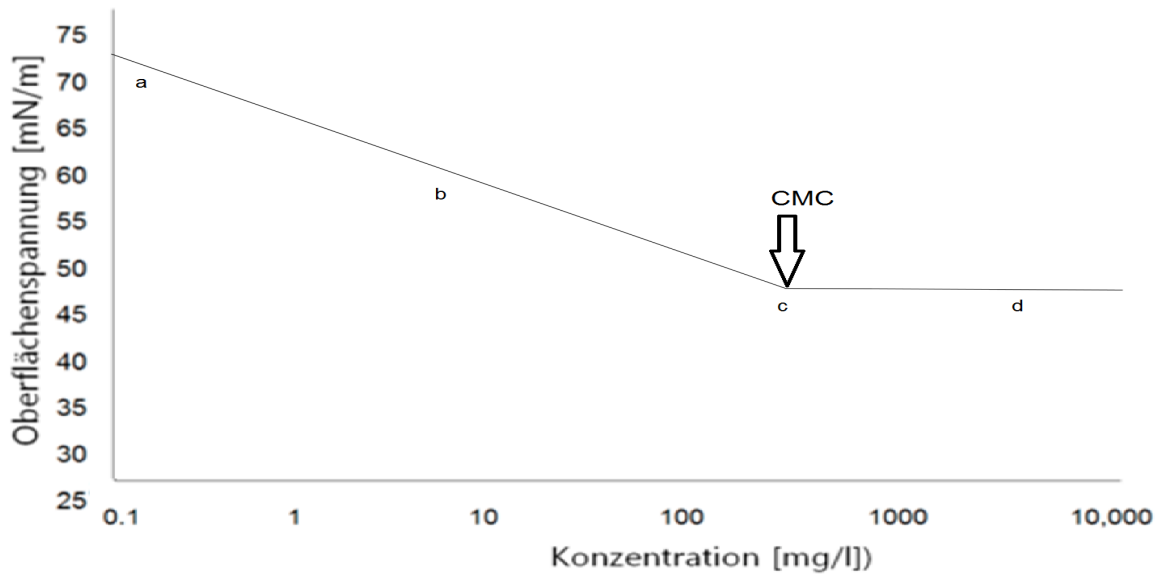


Abb. 3: Bildung von Mizellen. Die Oberflächenspannung sinkt bei Zunahme der Tensidkonzentration bis zur CMC. Die Abbildungen zeigen die Bildung einer Grenzschicht zwischen Luft und Wasser, bei der die hydrophoben Monomeranteile in Richtung Luft und die hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser hinweisen sowie die Bildung einer Mizelle, in deren Mitte sich die hydrophoben Schwänze vereinigen und die hydrophilen Anteile nach außen ragen, aus den einzelnen freien Monomeren. Alle Phasen treten gleichzeitig und nebeneinander im Gleichgewicht auf.

In Abhängigkeit von Art und Geometrie der Moleküle des Tensids, der Natur der Lösungsmittel sowie der Temperatur ergeben sich unterschiedliche Mizellenformen und -größen (Abb. 4) (Benrraou and Zana 2005).

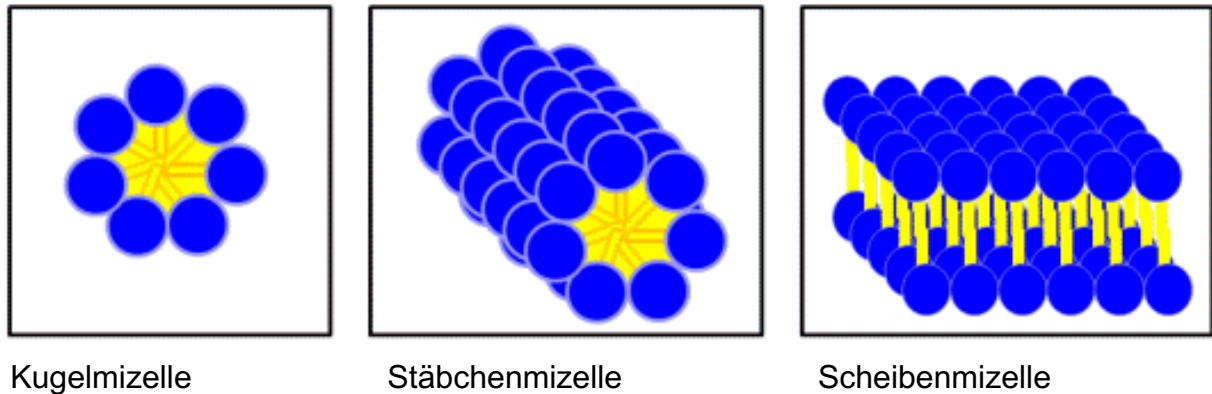


Abb. 4: Mizellentypen. Je nach Gestalt der sich zusammenlagernden Moleküle resultieren unterschiedliche Formen von Mizellen (Baumann 2014).

2.6. Detergenzien in der Biochemie

In der Biochemie werden beispielsweise Natriumlaurylsulfat (SDS, anionisches Tensid) sowie die zur Gruppe der nicht ionischen Tenside zählenden Polysorbat 20, Digitonin, Octylglucosid oder Octoxinol-9 (Triton X-100) zur Solubilisierung von Proteinen sowie zur Extraktion membrangebundener Proteine verwendet (Lin and Guidotti 2009). Dies wird zur Reinigung und Charakterisierung von Proteinen und auch bei der Proteomanalyse genutzt. Da dabei nicht nur solubilisiert wird, sondern auch Protein-Protein-Wechselwirkungen verändert werden, besteht die Gefahr der Denaturierung.

Bei verschiedenen analytischen Methoden, wie zum Beispiel der SDS-PAGE werden bewusst Detergenzien eingesetzt, um die Proteine absichtlich zu denaturieren und Proteinkomplexe zu trennen, um exakte Molekulargewichte der Einzelketten bestimmen zu können beziehungsweise eine hohe Proteinauflösung zu erreichen.

2.7. Triton X-100

Eine besondere Bedeutung im Rahmen der Proteinanalytik kommt Triton X-100, auch Octoxinol-9 genannt, zu (Abb.1, 5). Es zählt zu den nicht-ionischen Tensiden und besteht aus einer hydrophilen Polyethylenoxid- sowie einer aromatischen hydrophoben Kohlenwasserstoffgruppe. Das unverdünnte Triton X-100 ist eine klare farblose bis gelblich visköse Flüssigkeit, die sich in Wasser gut löst. Außerdem besitzt es eine Dichte von $1,07 \text{ g/cm}^3$ und einen Siedepunkt bei über 200°C (Carl Roth GmbH und Co KG 2014). Der Vorteil von Triton X-100 liegt darin, dass es Proteine nicht oder nur sehr schwach denaturiert und deshalb in der Lage ist, die Proteine in ihrer nativen Form aus der Membran herauszulösen. Die CMC von Triton X-100 hängt vom Lösungsmittel ab und liegt in üblichen wässrigen Lösungen bei 25°C etwa bei ca. $0,3 \text{ mM}$. Triton X-100 bildet große sphärische Mizellen, die aus etwa 140 zusammengelagerten Molekülen bestehen (Aggregationszahl 140) (Opitz et al. 2015).

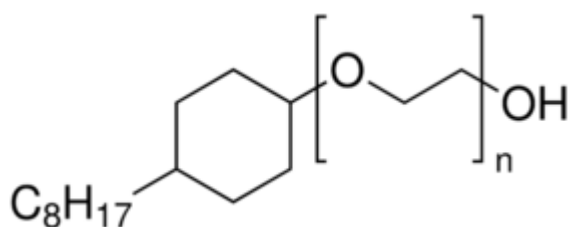


Abb. 5: Triton X-100 (Sigma-Aldrich 2015)

2.8. Entfernung von Detergenzien

Bei Anwesenheit von Detergenzien in Proteinlösungen können Probleme bei Downstream-Analysen auftreten. Dazu zählen die Signalunterdrückung bei der Massenspektrometrie, eine Verschiebung der Retentionszeiten und dadurch verfälschte Molekulargewichte bei verschiedenen Chromatografieverfahren durch

Protein-Detergens-Komplexe (Canas et al. 2007). Außerdem stören ionische Detergenzien auch bei der Ionenaustauschchromatografie oder der isoelektrischen Fokussierung.

Aus diesem Grund müssen die Detergenzien oft präanalytisch aus den Proteinlösungen entfernt werden. Dies gelingt durch verschiedene Verfahren wie der Größenausschluss- und Ionenaustauschchromatografie, Ultrazentrifugation, Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Ethylacetat (Yeung et al. 2008) oder Dichlormethan (Suzuki and Kabayama 2012), Adsorption an Bio-Beads oder mittels Dialyse (Canas et al. 2007).

Detergenzien mit einer hohen CMC beziehungsweise kleinen Aggregationszahl sind leichter aus der Probe mittels Dialyse zu entfernen, da bei ihnen nicht so hochmolekulare Komplexe gebildet werden wie bei Detergenzien mit einer niedrigen CMC und hohen Aggregationszahl (zum Beispiel Triton X-100) (Rehm und Letzel 2009).

Für Detergenzien, die schlecht zu dialysieren sind, wurden zahlreiche alternative Verfahren entwickelt, die helfen sollen, sie präanalytisch zu entfernen. So kann man sie durch Adsorption an makroporöse synthetische Polymere binden und so aus Lösungen eliminieren. Dies gelingt einerseits dadurch, dass die Lösung über eine Säule gegeben wird oder andererseits, dass das Polymer im Puffer außerhalb des Dialyseschlauchs für einen Abtrag des Tensids aus dem Detergensmonomer-Mizellen-Gleichgewicht zuständig ist. Hierbei beeinflussen die Art des Tensids und des Polymers die Detergensbindungskapazität. Bei Verwendung von Spin-Säulen mit ausgewählten Harzen konnte eine Verbesserung um 95% bei den Massenspektrometriesignalen erzielt werden. Hierbei wurden die Detergenzien effektiv entfernt, bei gleichzeitig hoher Rückgewinnung von Proteinen und Peptiden (Antharavally et al. 2011).

Die Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse oder Ultrazentrifugation geht sehr langsam aufgrund der niedrigen CMC und der damit zu erwartenden kleinen Konzentration an freien Detergensmonomeren. Eine relativ einfache Methode gibt es mit den Bio-Beads. Diese ist aber viel zu preisintensiv, um sie für große Probenzahlen anzuwenden (Bio-Rad Laboratories GmbH 2015).

Zusammengefasst sind alle beschriebenen Verfahren zur Detergensentfernung entweder sehr aufwändig und/oder zu teuer und gehen mit Probenverdünnung beziehungsweise Probenverlust einher (Opitz et al. 2015). Deshalb sind diese Verfahren für hohe Probenzahlen bei analytischen High-Throughput-Verfahren, wozu auch Proteomuntersuchungen zählen, ungeeignet.

2.9. Dialyse

Die Dialyse wird seit langem zur Eliminierung von Salzen, störenden Stoffen beziehungsweise zum Mediumwechsel von Proteinlösungen verwendet. Dabei bedient man sich einer semipermeablen Membran, die Poren in einem definierbaren Molekulargewichtsbereich besitzt. Stoffe mit einem kleineren Molekulargewicht als der Cut-off der Membranen können permeieren, Substanzen mit einem Molekulargewicht oberhalb des Cut-off, in der Regel Proteine, können die Membran nicht passieren. Die Proben werden in den Dialyseschlauch gegeben, der in einem Behälter platziert wird, das eine Lösung, die der Wunschzusammensetzung der Probe entspricht, enthält. Alle permeablen Stoffe diffundieren entlang ihres Konzentrationsgradienten bis zur Gleichverteilung (Gleichgewicht).

Der Stoffaustausch beruht auf der Diffusion. Mit diesem 2. Fickschen Gesetz (Abb. 6), können Konzentrationsveränderungen eines Stoffes innerhalb einer nicht homogenen Lösung dargestellt werden.

$$x = D \cdot \sqrt{t}$$

$$t_{max} = \frac{x^2}{2 \cdot D}$$

x	Diffusionsstrecke
D	Diffusionskonstante
t	Diffusionszeit
t _{max}	maximale Diffusionszeit

Abb. 6: 2. Ficksches Gesetz-Diffusionsgleichung (Cornelsen Schulbuchverlage GmbH 2015)

Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl die Diffusionskonstante, die von der Größe inklusive der Hydrathülle und der Form der gelösten Teile abhängt, aber vor allem die Diffusionsstrecke eine wesentliche Bedeutung für die Zeitdauer der Diffusion haben. Die Diffusionsstrecke hat den größten Einfluss, da sie in zweiter Potenz in die Gleichung eingeht. Daneben spielt jedoch auch die Temperatur, das Konzentrationsgefälle sowie die Porengröße der semipermeablen Membran eine entscheidende Rolle. Die Temperatur beeinflusst dabei neben der Diffusionsgeschwindigkeit auch die Proteinstabilität.

Die Dialyse lässt sich daher auch zur Entfernung niedermolekularer Detergenzien anwenden. Allerdings sind, wie oben dargestellt, oberhalb der CMC auch Mizellen und Komplexe mit anderen Lösungsbestandteilen (z.B. Proteinen) vorhanden, die sehr hohe Molekulargewichte erreichen und daher nicht permeieren können. Durch Dialysemembranen mit Porengrößen, die üblicherweise Proteine zurückhalten, können lediglich monomere Detergensmoleküle oder kleine Mizellen diffundieren. Die in der Probe verbleibenden hochmolekularen Mizellen geben entsprechend der aktuellen Monomerkonzentration und der Gleichgewichtskonstanten einzelne Monomere ab. Diese Reaktion ist in der Regel sehr langsam und die Aggregationszahl von Mizellen kann sehr groß sein. Dementsprechend lassen sich manche Detergenzien, wie Triton X-100, auf diese Weise praktisch nicht entfernen.

2.10. MD-100

Eine Entwicklung des Institutes für Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, die von der Firma Scienova GmbH zur Marktreife gebracht wurde, sind die MD-100 (Abb. 7). Diese Mikrodialysatoren sind speziell an kleine Probenvolumina und Hochdurchsatzverfahren adressiert. Sie ermöglichen auf Grund ihrer Geometrie mit sehr kleinen Schichtdicken eine sehr schnelle Dialyse für Volumina von 10-100 µl im Mikroplattenformat. Dieses Dialysesystem garantiert ein sofortiges Experimentieren ohne weitere Vorbereitung und ist mit üblichen Pipettenspitzen befüllbar. Zur visuellen Überprüfung der eingefüllten Probemenge befindet sich jeweils nach 25 µl eine Skalierung. Die Tools besitzen eine geringbindende Cellulosemembran und gewährleisten so die verlustarme Behandlung von DNA, RNA, Oligonukleotiden und Proteinen sowie die Aufkonzentrierung von Proben (Scienova GmbH 2015). Allerdings zeigen die MD-100 auch Nachteile. Beispielsweise ist keine restlose Probenrückgewinnung aus den Tools sowie keine praktikable Parallelisierbarkeit (>8) möglich. Diese Nachteile gilt es zukünftig durch eine Veränderung der Geometrie der Dialysetools zu umgehen.



Abb. 7: Xpress Micro Dialyzer MD-100 (Scienova GmbH)

2.11. Neu entwickelte Mikrodialysator-Prototypen

Die gegenwärtig vergegenständlichten Mikrodialysatoren MD-100 lassen sich auf Grund von herstellungstechnisch bedingten Toleranzen nicht über einen Achterriegel hinaus parallelisieren beziehungsweise automatisieren. Außerdem sind sie auch nicht im gesamten Volumenbereich von 10–600 µl, der für die proteomische Probenbehandlung wünschenswert wäre, ausgelegt. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit den Forschungswerkstätten des Universitätsklinikums Jena neue Prototypen von Mikrodialysatoren entwickelt, die beide Nachteile mit einer neuen Geometrie und mit Dichtelementen umgehen sollen. Diese Prototypen sind vom Aufbau anders konzipiert. Die neue Geometrie sieht eine zusätzliche Kapillare vor, die zum Befüllen und zum Wiedergewinnen der Proben dient. Um einen größeren Bereich von Probenvolumina bei Beibehaltung des 96-er Mikroplattenrasters realisieren zu können, wurde eine konische Grundform eingeführt. Aufgrund der nach oben wachsenden Diffusionsstrecke ist ein höherer Zeitbedarf zu erwarten. Ein Dichtelement wurde konstruiert, um die Dialysatoren versatil mit den unterschiedlichsten Pipettenspitzen bearbeiten zu können (Abb. 8).

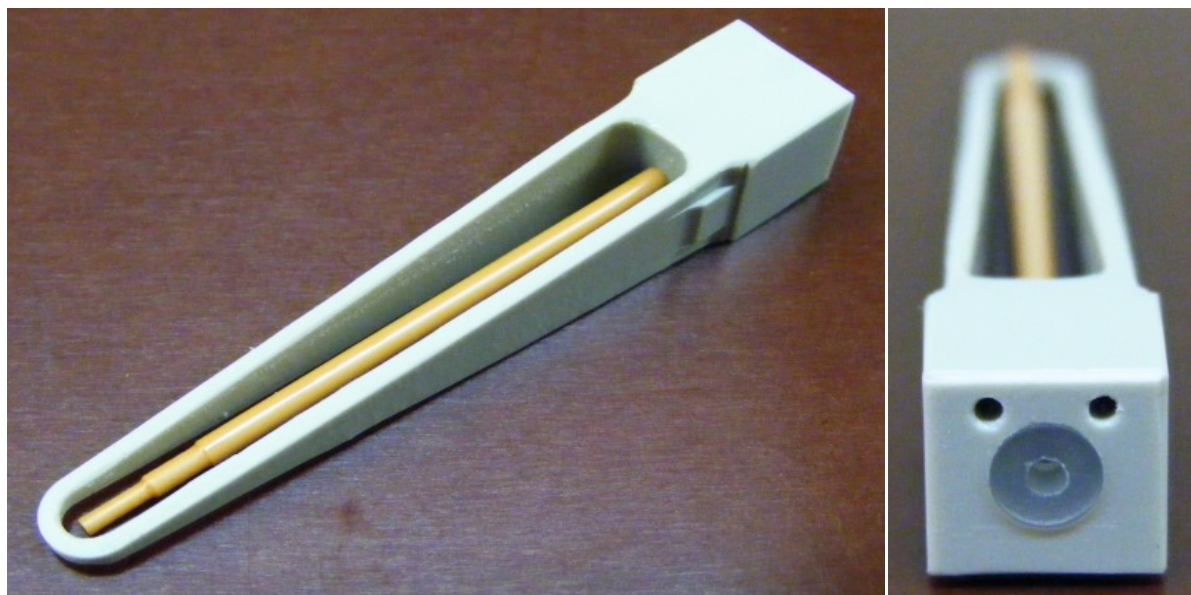


Abb. 8: neu entwickelter Mikrodialysator-Prototyp (Grundkörper ohne Dialysemembran)

3. Aufgabenstellung

3.1. Suche nach Möglichkeiten zur Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse

Es soll eine Möglichkeit der Erhöhung der CMC von Triton X-100 durch geeignete Mediumzusätze ermittelt werden. Im Erfolgsfall soll die Verwendbarkeit dieses Phänomens zur Verbesserung der Entfernbarekeit dieses Detergens mittels Dialyse geprüft werden.

Dazu soll die CMC von Triton X-100 in wässrigen Lösungen ohne und mit verschiedenen Zusätzen (organische Lösungsmittel, chaotrope Stoffe sowie Gemische aus beiden) gemessen und verglichen werden. Es ist dazu erforderlich, eine Methode zur Messung der CMC zu etablieren, um die Effekte mit Zusätzen von organischen Lösungsmitteln und chaotropen Stoffen darauf zu erkennen. Diejenigen Zusätze, die die stärksten Erhöhungen der CMC verursachen, sollen anschließend bei der Dialyse eingesetzt und deren Effekt auf die Dialysegeschwindigkeit beziehungsweise -effizienz geprüft werden. Dabei sollen Lösungen ohne und auch mit Proteinen verwendet werden.

3.2. Testen neuer prototypischer Mikrodialysatoren

Es sollen die neu entwickelten prototypisch vorliegenden Tools hinsichtlich ihrer Dialysekinetik mit Modellsubstanzen, ihrer Parallelisierbarkeit und der Wiederfindung von Analyten im Vergleich zu den bis jetzt verwendeten MD-100 untersucht werden. Dazu müssen das Handling, die Protein- und Volumenwiederfindungsraten sowie der Zeitverlauf der Dialyse von niedermolekularen Modellanalyten ermittelt werden. Die Ergebnisse sollen in die nachfolgende Gestaltung eines neuen spritztechnisch umsetzbaren Produktes einfließen.

4. Materialien und Geräte

4.1. Materialien

Folgende Materialien wurden verwendet:

Deep-Well-Platte: 2 ml (Brand GmbH + CO KG, Art.-Nr.: 701354)

Pipettenspitzen: 200 µl- und 1000 µl (Brand GmbH + CO KG, Art.-Nr.: K-227-7, K-172-6)

PS- Mikroplatte 96er, F-Form, flat bottom, schwarz (Greiner Bio-One GmbH, Art.-Nr.: 655076)

Reaktionsgefäße mit Deckelverriegelung: 0,5 ml-, 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße (BRAND, Hausliste)

UV-STAR-Plate, 384-Well, F- Form (Greiner Bio-One GmbH, Art.-Nr.: 781801)

Xpress Micro Dialyzer MD-100 (Scienova GmbH, Art.-Nr.: 40072)

Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Art.-Nr.: 227261)

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Allo-Phycocyanin (ANA SPEC, Art.-Nr.: 82002)

B-Phycoerythrin (ANA SPEC, Art.-Nr.: 82001)

BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Art.-Nr.: 233228)

C-Phycocyanin (ANA SPEC, Art.-Nr.: 82003)

DMSO (Sigma-Aldrich CO, Art.-Nr.: D8779)

Ethanol (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: 9065.2)

Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich CO, Art.-Nr.: B2261)

Guanidinhydrochlorid (Sigma-Aldrich CO, Art.-Nr.: 50940-1KG)

Guanidinthiocyanat (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: 0017)

Hämoglobin from bovine blood (Sigma-Aldrich CO, Art.-Nr.: 51292-25g)

Hämoglobin-Reagenz (Bioanalytic GmbH, Art.-Nr.: 004001-1010)

Harnstoff (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: 3941.1)

Methanol (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: 7342.1)

Natriumazid (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: K3051)

Natriumthiocyanat (Chempol, Art.-Nr.: 905420178)

P-Nitrophenol (Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.06798.0100)

Propanol (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: 6752.2)

R-Phycocyanin (ANA SPEC, Art.-Nr.: 82004)

Rinderserumalbumin (SERVA Electrophoresis GmbH, Art.-Nr.: 11932)

Triethanolamin (TEA) (Chemapol, Art.-Nr.: 900400577)

TRIS (Carl Roth GmbH + Co KG, Art.-Nr.: 4855.2)

Triton X-100 (Ferak Laboratory GmbH, Art.-Nr.: 505002)

4.2. Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Pipetten: 5-50 µl-, 10-100 µl-, 20-200 µl-, 200-1000 µl-Pipette (Brand GmbH + CO KG)

Reader: Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices),

Spectra Max Gemini (Molecular Devices)

Vortexer (Scientific Industries, Vortex-2-Genie)

Wasserbad (LAUDA E200)

Zentrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5403 R)

5. Methoden

5.1. Möglichkeiten zur Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse

5.1.1. Bestimmung der CMC

Zur Bestimmung der CMC von Triton X-100 verwendeten wir die Methode von Jumpertz (Jumpertz et al. 2011) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342. Die Fluoreszenzintensität dieses Fluorophors ist vom Umgebungsmilieu abhängig. In wässriger Umgebung fluoresziert der Stoff praktisch nicht, in hydrophober Umgebung wie im Inneren der Mizellen dagegen maximal. Dieser Fluoreszenzfarbstoff dient daher zur Detektion von Mizellen, wird in ihr Inneres aufgenommen und lässt dadurch die Fluoreszenzintensität drastisch ansteigen. Infolgedessen lässt sich auf die Präsenz und Konzentration an entstandenen Mizellen schließen.

Dazu wurden Triton X-100-Verdünnungsreihen (0,0007%-0,6666% (w/v) in 100 mM TRIS/HCl pH=7,4, 0,02% NaN₃ (w/v) (Puffer A) hergestellt, wobei sich die Konzentration bei jedem Verdünnungsschritt halbierte. Anschließend wurde jeder dieser Proben (Triplikate, Volumen 100 µl, in einer 96er PS-Mikroplatte) 50 µl des 50 µM Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342 in destilliertem Wasser zugegeben und jede Spalte mit einer Multipipette gründlich durchgemischt (achtmal aufgezogen und wieder ausgestoßen). Nach einer kurzen Zentrifugation (2 min, 326xg) zur Egalisierung der Minisci folgte nun die Fluoreszenzmessung bei 490 nm (ex 355 nm) im Reader Spectra Max Gemini. Anschließend wurden die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten als Funktion der Detergenzkonzentration dargestellt (Abb. 9).

Durch das Einzeichnen von zwei Geraden, eine durch die nahezu horizontal verlaufenden Messpunkte bei niedrigen Konzentrationen unterhalb der CMC und die zweite durch mindestens zwei Datenpunkte, die den steilsten Anstieg ausmachen, wurde die CMC als diejenige Konzentration, die am Schnittpunkt beider Geraden gilt, ermittelt (Abb. 9).

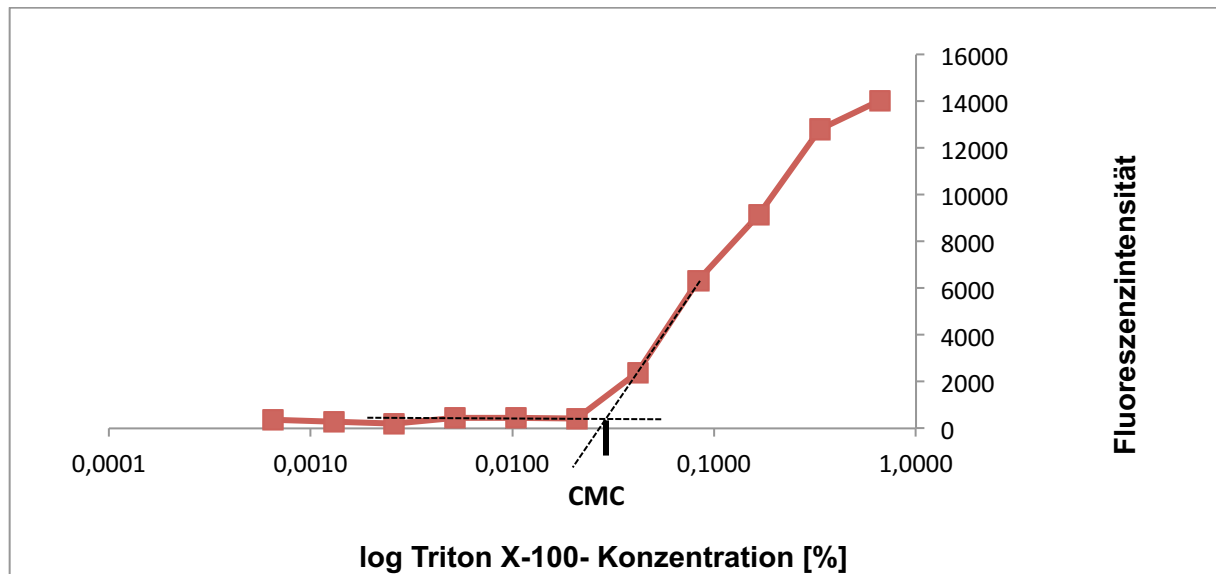


Abb. 9: Prinzip der Ermittlung der CMC von Triton X-100. Die Grafik zeigt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342 als Funktion der Konzentration von Triton X-100 in Puffer A. Durch Anpassung zweier Geraden an die Fluoreszenz-Messwerte in den beiden unterschiedlich ansteigenden linearen Anteilen der Kurve kann die CMC näherungsweise ermittelt werden.

5.1.2. Möglichkeiten der CMC-Verschiebung

Es wurden unterschiedliche Additive in verschiedenen Konzentrationen in Puffer A zu den Triton X-100-Proben zugegeben und die CMC unter diesen Bedingungen ermittelt. Die untersuchten Additive und deren Konzentrationen waren:

- chaotrope Stoffe: Guanidinhydrochlorid (0,16-7,2 M), Harnstoff (0,16-7,2 M), Natriumthiocyanat (0,1-4,5 M)
- organische Lösungsmittel: Methanol (2-90%), Ethanol (2-90%), 2-Propanol (2-90%), DMSO (2-90%)
- Kombinationen aus chaotropen Stoffen und organischen Lösungsmitteln.

Wie in 5.1.1. beschrieben, wurde die CMC in Anwesenheit dieser Additive auch hier nach der Methode von Jumpertz (Jumpertz et al. 2011) ermittelt.

5.1.3. Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse in Anwesenheit von Additiven

Nun galt es zu untersuchen, ob diejenigen Zusätze, die zu einer Erhöhung der CMC führen, auch eine schnellere Entfernung von Triton X-100 ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Additive Methanol, Ethanol, Propanol, DMSO, Guanidinhydrochlorid und Harnstoff und Kombinationen aus Methanol und Ethanol sowie aus Methanol und Guanidinhydrochlorid ausgewählt. Getestet wurden jeweils verschiedene in dem Ergebnisteil aufgeführte Konzentrationen beziehungsweise Konzentrationsverhältnisse bei Kombinationen dieser Additive in Puffer A. Alle Versuche wurden als technische Triplikate durchgeführt. Dabei wurden drei MD-100 mit jeweils 100 µl der Proben (0,5%igen Triton X-100 (w/v) in Puffer A ohne und mit Additiven) bestückt. Die jeweilige Konzentration der Additive war in Probe und Außenflüssigkeit (1,6 ml) identisch. Die Dialyse wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) durchgeführt. Es wurde die Restmenge an Triton X-100 nach 24, 48 und 72 Stunden ermittelt. Für alle Untersuchungen wurde das Außenmedium stets nach einem Intervall von 24 Stunden erneuert.

5.1.4. Temperaturabhängigkeit der Dialyseeffizienz

Die Temperaturabhängigkeit der Dialyseeffizienz wurde bei 6°C im Kühlraum, bei Raumtemperatur von 25°C und bei 36°C im Trockenschrank bei Dampfsättigung in einem abgeschlossenen Außengefäß ermittelt. Um diese Bedingungen zu erreichen, wurden mit dem jeweiligen Lösungsmittel getränkte Papiertücher in die geschlossenen Behälter gelegt. Die Proben wurden für 24 Stunden als Dreifachbestimmung dialysiert. Dies erfolgte beispielhaft für 30% Ethanol, 4 M Harnstoff und als Kontrolle ohne Additiv. Auch hier wurden 100 µl der Proben in die MD-100 eingebracht. Die Additive befanden sich in identischer Konzentration sowohl in der Probe als auch in der Außenflüssigkeit (1,6 ml). Nach 24 Stunden Dialysezeit unter verschiedenen Umgebungstemperaturen wurden die Restmengen an Triton X-100 ermittelt.

5.1.5. Proteinbestimmung

Für die Messung der Proteinkonzentrationen wurde die BCA Methode (Pierce, Number 233228) verwendet und entsprechend Herstellerangaben in Mikroplatten durchgeführt.

5.1.5.1. Einfluss von Triton X-100 auf die Proteinbestimmung

Als Modellprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Es wurden Lösungen mit variablen BSA-Konzentrationen (0,05-1 mg/ml) und verschiedenen Triton X-100-Konzentrationen (0,01% und 0,1%, w/v) jeweils in Puffer A hergestellt. Anschließend wurden jeweils 200 µl BCA-Arbeitsreagenz zu 10 µl-Proben hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C im Wasserbad und darauf folgender Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorbanz bei 562 nm im Spectra Max Plus Reader gemessen.

5.1.6. Testung der Stabilität der fluoreszierenden Phycobilinproteine

Als Nächstes sollte die praktische Anwendbarkeit der Entfernung von Triton X-100 in Anwesenheit von einem Modellprotein in realitätsnaher Konzentration geprüft werden. Da dabei die UV-Absorbanz des Proteins und von Triton X-100 nicht zu unterscheiden sind, wurden Proteine gesucht, die chromophore Gruppen tragen und daher in sehr kleinen Konzentrationen und in einem anderen spektralen Bereich empfindlich messbar sind. Dazu musste zunächst die Stabilität der optischen Eigenschaften der verfügbaren fluoreszierenden Phycobilinproteine der Firma ANA SPEC Eurogentec Group in den infrage kommenden Lösungen geprüft werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um: B-Phycoerythrin, R-Phycoerythrin, R-Phycoerythrin 2, C-Phycocyanin und Allo-Phycocyanin. Dazu wurde jedes dieser Phycobiline (1 mg/ml) in 100 mM TEA/HCl pH=7,4, 0,02% NaN₃ (w/v) (Puffer B) beziehungsweise in Puffer B mit 5 M Harnstoff und 1% Triton X-100 gelöst und sowohl bei 8°C als auch bei Raumtemperatur für drei Tage inkubiert. Danach wurde

die Fluoreszenzintensität bei den jeweiligen spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen mit denjenigen am Beginn des Versuchs hergestellten Lösungen verglichen.

5.1.7. Entfernung von Triton X-100 aus R-Phycoerythrin-haltigen Lösungen mittels Dialyse

Nach Gewissheit über die Stabilität der Fluoreszenz dreier Phycobiline, B-Phycoerythrin, R-Phycoerythrin und R-Phycoerythrin 2 sowohl in Puffer B ohne als auch mit Harnstoff konnte nun die Dialysierbarkeit von Triton X-100 aus Lösungen mit diesen Proteinen überprüft werden. Dazu wurde R-Phycoerythrin ausgewählt. Es weist die höchste Fluoreszenzintensität auf und kann deshalb in sehr kleinen, realen proteomischen Proben nahekommenden Konzentrationen untersucht werden. Für diesen Versuch wurden jeweils drei Proben mit R-Phycoerythrin (0,02 mg/ml) und Triton X-100 (0,5%, w/v) in Puffer B ohne und mit 5 M Harnstoff angesetzt. Eine Serie wurde bei 8°C und die andere bei Raumtemperatur dialysiert, jeweils ohne Lichteinfall, da Phycobiline lichtempfindlich sind. Dafür wurden die Dialysegefäße in einer lichtundurchlässigen Box aufbewahrt. Die Dialyselaufzeit betrug 72 Stunden, wobei das Dialysat jeweils nach 24 Stunden gewechselt wurde.

5.2. Testung der Proteinwiederfindung beim Rückgewinnen der Proben aus

MD-100

Die MD-100 wurden sowohl einzeln als auch im Achterriegel parallel mit 100 µl Hämoglobin-Lösung (1,25 g/L in Cyanhämiglobinreagenz) befüllt und mit einer Volumen-Einstellung von 130 µl wieder entladen. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde das Volumen der rückgewonnenen Probe und deren Absorbanz bei 420 nm und 700 nm gemessen und anhand einer Eichkurve (Abb. 10) die Wiederfindung des Proteins ermittelt.

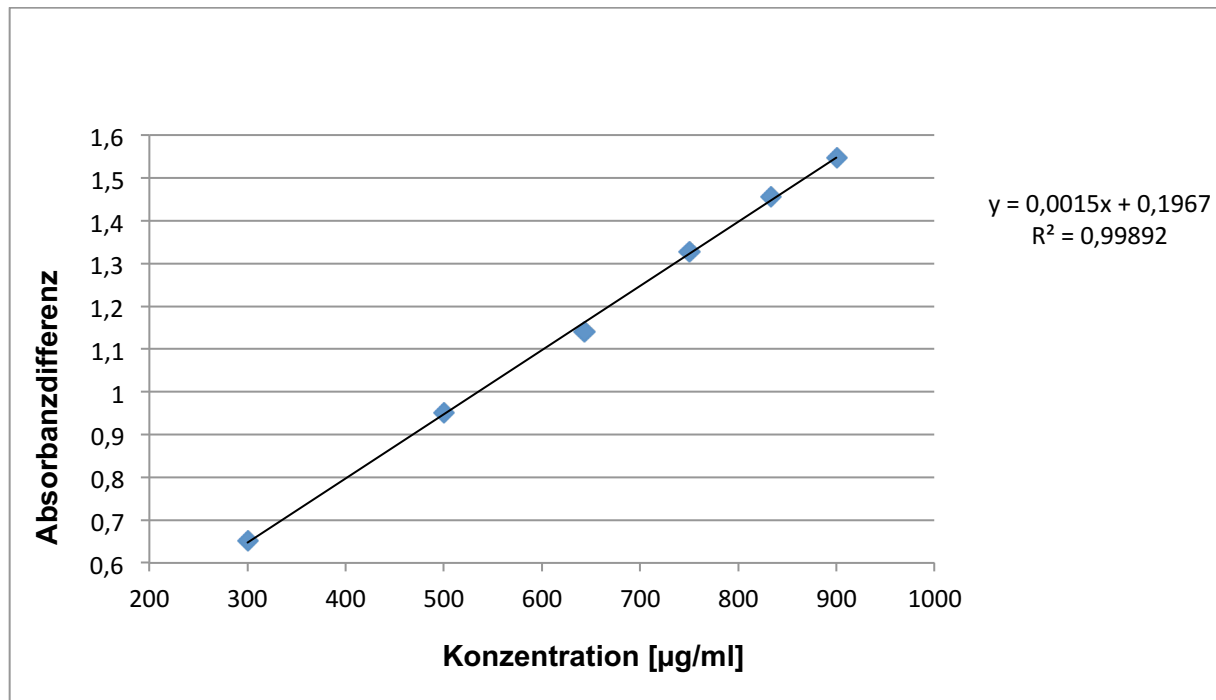


Abb. 10: Cyanhämglobin-Eichgerade, Absorbanz (A420 nm minus A700 nm) in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration.

5.3. Testung neu entwickelter Mikrodialysator-Prototypen

5.3.1. Probenwiederfindung

Die neuen Mikrodialysator-Prototypen sollen hinsichtlich ihrer Praktikabilität beim Befüllen, Rückgewinnen sowie hinsichtlich der Volumen- und Proteinwiederfindung geprüft werden. Anfänglich wurden dazu Silikongummidichtkörper mit zwei unterschiedlichen Innendurchmessern (1,5 mm und 0,75 mm) verwendet und unterschiedliche Füllvolumina mit Proben von Cyanhämglobin (siehe oben) getestet (50 µl, 100 µl, 300 µl und 500 µl). Nach dem Befüllen der Tools wurden die Proben mit einer Pipetteneinstellung, die um 30 µl größer als das Füllvolumen war, entladen. Die Proteinquantifizierung erfolgte wie oben beschrieben.

Bei dem Füllvolumen von 50 µl wurde geprüft, inwieweit sich die Wiederfindung durch Nachspülen erhöhen lässt. Dazu wurde nach dem Entladen der Probe nochmals 50 µl Reagenzlösung in die Mikrodialysatoren pipettiert, mehrfach aspiriert

und ausgestoßen und danach mit derselben Pipettenspitze wie bei der ersten Entladung wiedergewonnen.

5.3.2. Parallelisierbarkeit der neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen

Obwohl die Prototypen nicht als Achter-Satz vorlagen, sollte dennoch deren Verwendbarkeit für parallelisierte Arbeitsschritte getestet werden. Zu diesem Zweck wurde ein Satz aus acht einzelnen Tools, die in einer Deepwell-Platte justiert werden konnten, mit Multipipetten, verschiedenen Pipettenspitzen (10-100 µl sowie 50-300 µl) und unterschiedlichen Volumina (50 µl, 100 µl, 200 µl) von Cyanhämoglobin (siehe oben) gefüllt. Die Entladung erfolgte ebenfalls mit der 8-Kanal-Multipipette, wieder mit einer 30 µl höheren Einstellung als dem jeweiligen Füllvolumen. Hier wurde ebenfalls die Wiederfindung von Cyanhämoglobin ermittelt (siehe 5.3.1.). Damit konnte auf das zurückgewonnene Probenvolumen geschlossen werden.

5.3.3. Vergleich der Dialysegeschwindigkeiten von p-Nitrophenol mit MD-100 und den neuen Mikrodialysator-Prototypen

Als Nächstes sollte geprüft werden, ob die Dialysegeschwindigkeit bei Verwendung der neu entwickelten Tools, die im oberen Bereich größere Schichtdicken (ca. 6 mm) und damit größere Diffusionswege aufweisen, erwartungsgemäß geringer als mit MD-100 (durchgängig 1,2 mm) ist. Dafür wurden je drei Mikrodialysatoren MD-100 und drei Mikrodialysatoren-Prototypen mit 100 µl 5 mM p-Nitrophenollösung in Puffer C (10 mM TRIS/HCl, pH=7,4, 0,02% NaN₃) beladen. Als Dialysezellen dienten diesmal einheitlich 15 ml-Zentrifugenröhrchen, die mit jeweils 3 ml Puffer C befüllt waren. Nach 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden die Tools vorsichtig entnommen, um im Inneren keine Vermischung zu erzeugen. Das Dialysat wurde gemischt und jeweils 50 µl entnommen und zu 100 µl vorgelegtem Phosphatpuffer (20 mM Na₃PO₄/HCl, pH=11, Puffer D) in die PS-Mikroplatte gegeben und gemischt. Die entfernten 50 µl vom Dialysat wurden durch das Zuführen von 50 µl Puffer C

wieder ausgeglichen, sodass die Dialysemembranen immer vollständig mit Lösung benetzt waren. Danach erfolgte die Absorbanzmessung bei 405 nm und 700 nm im Spectra Max Plus Reader, um die Konzentration von p-Nitrophenol über die Extinktion zu ermitteln. Daraus wurde die dialysierte Menge an p-Nitrophenol nach dem jeweiligen Zeitabschnitt errechnet.

6. Ergebnisse

6.1. Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse

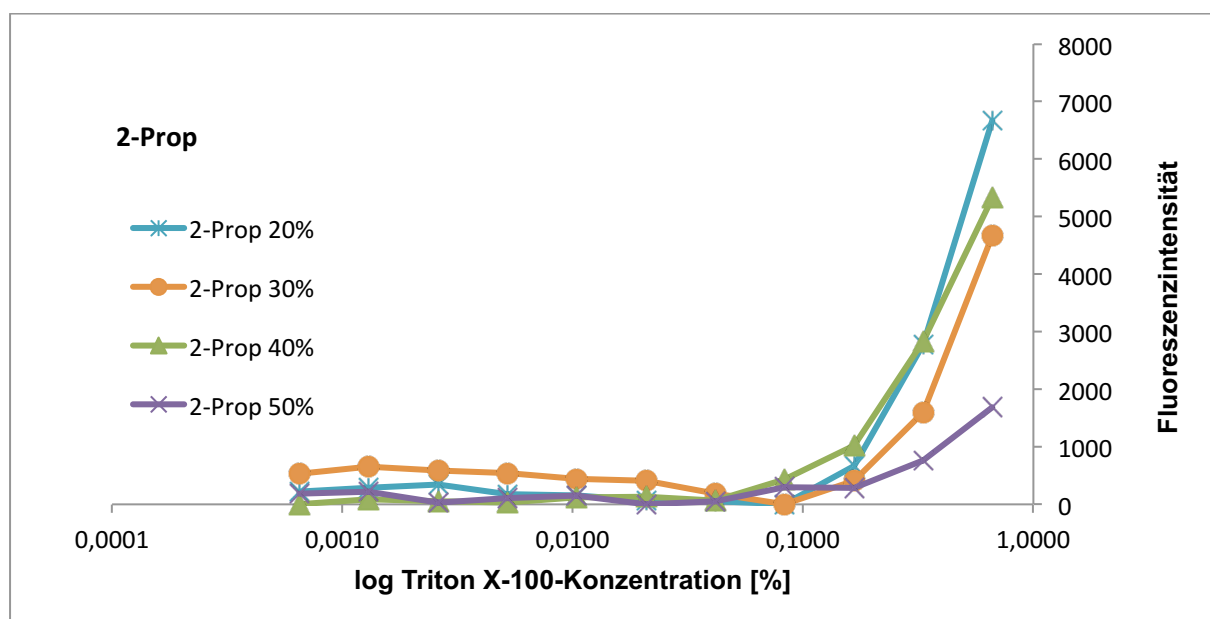
6.1.1. CMC von Triton X-100 in Puffer A

Die CMC in Puffer A wurde mit $0,014\% \pm 0,002\%$ (w/v) beziehungsweise mit $0,22 \pm 0,03$ mM, (Mittelwert \pm SD, n=10) ermittelt.

6.1.2 CMC von Triton X-100 in Puffer A bei Anwesenheit von verschiedenen Additiven

In Anwesenheit von jeweils einzeln zugesetzten chaotropen Stoffen (Guanidinhydrochlorid, Harnstoff bzw. Natriumthiocyanat), organischen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, 2-Propanol bzw. DMSO) und von verschiedenen Kombinationen daraus wurde wie erwartet eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten zu höheren Triton X-100-Konzentrationen und damit eine CMC-Erhöhung erreicht. Beispielhaft wird dies für 2-Propanol (Abb. 11a) und die Kombination von Guanidinhydrochlorid und 2-Propanol (Abb. 11b) gezeigt.

a)



b)

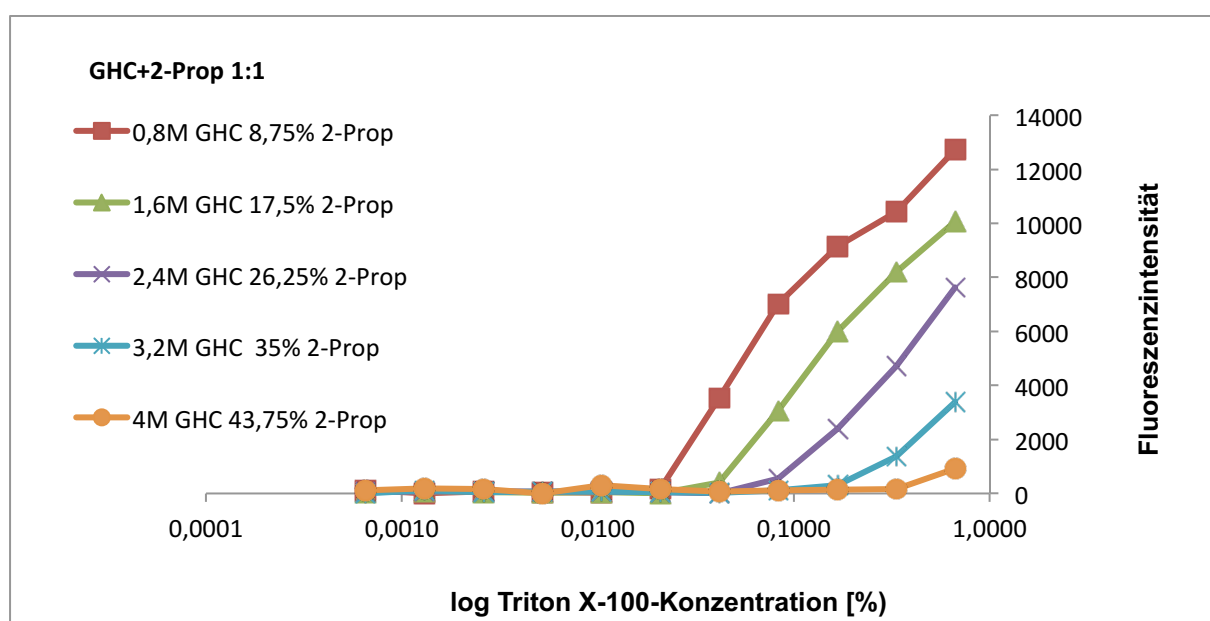


Abb. 11: Fluoreszenzintensitäten von Hoechst 33342 bei Anwesenheit von a) 2-Propanol und b) verschiedenen Kombinationen aus Guanidinihydrochlorid und 2-Propanol. Dafür wurden Lösungen mit angegebenen Konzentrationen der Additiva sowie Stammlösungen mit 10%igem Triton X-100 angesetzt und daraus dann Verdünnungsreihen mit den angegebenen Konzentrationen hergestellt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei 490 nm (ex 355 nm) gemessen.

In den nachfolgenden Grafiken (Abb. 12-32) ist die Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 bei individuellem und kombiniertem Zusatz von verschiedenen Additiven dargestellt. Die CMC wurde dazu stets, wie in der Methode 5.1.1 beschrieben, ermittelt. Bei allen Ansätzen wurde die CMC für Triton X-100 in Puffer A ohne weitere Zusätze als Kontrolle bestimmt. Diese lag durchgängig bei 0,014% (siehe oben).

a) Beeinflussung der CMC durch Lösungsmittel

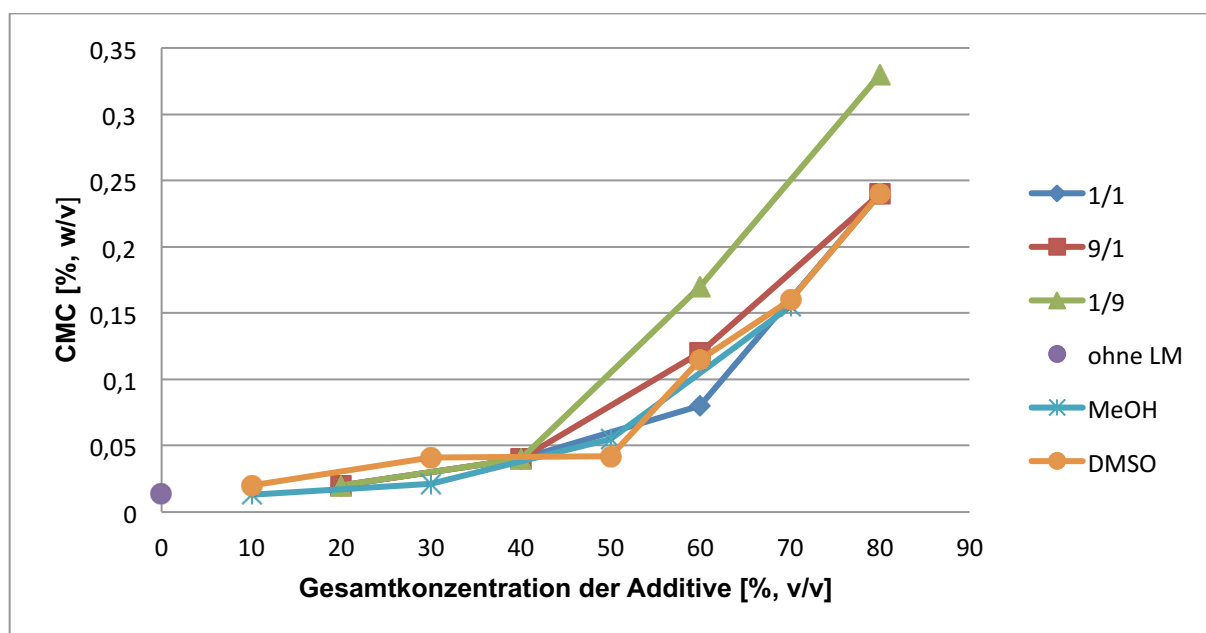


Abb. 12: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von DMSO und Methanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer DMSO/Methanol, (v/v)) untersucht.

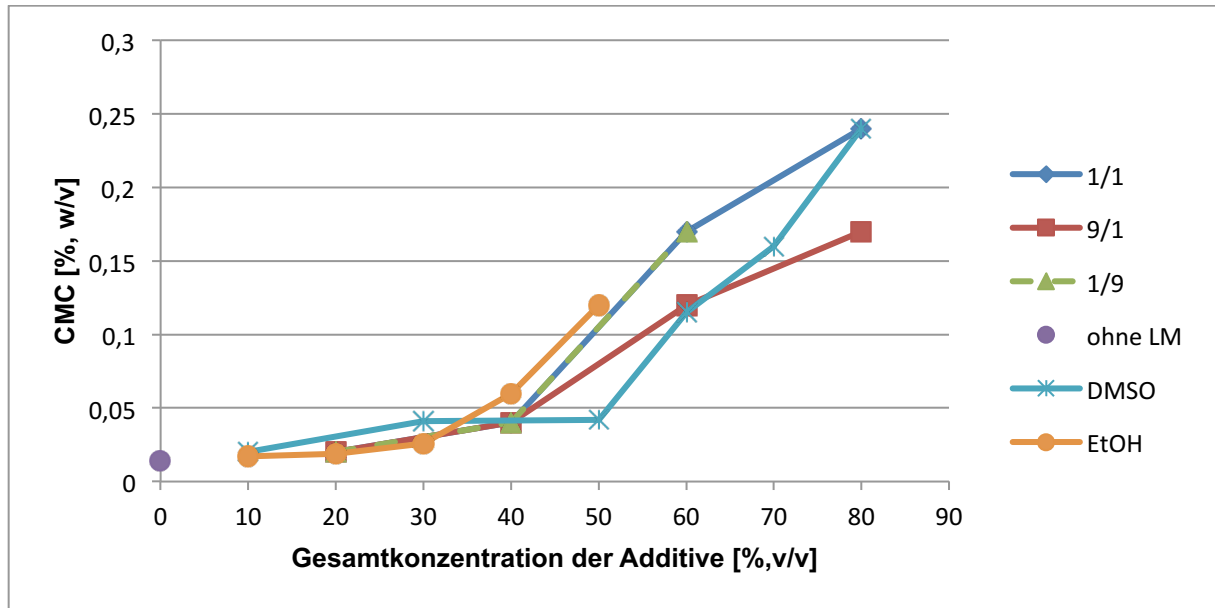


Abb. 13: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von DMSO und Ethanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer DMSO/Ethanol v/v)) untersucht.

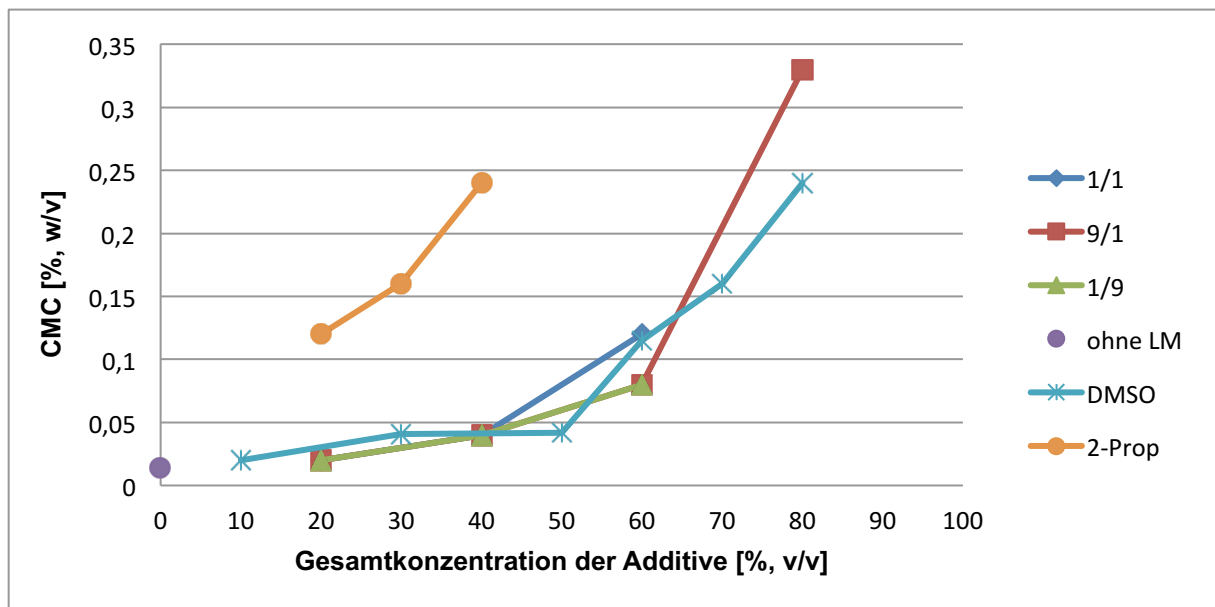


Abb. 14: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von DMSO und 2-Propanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer DMSO/2-Propanol (v/v)) untersucht.

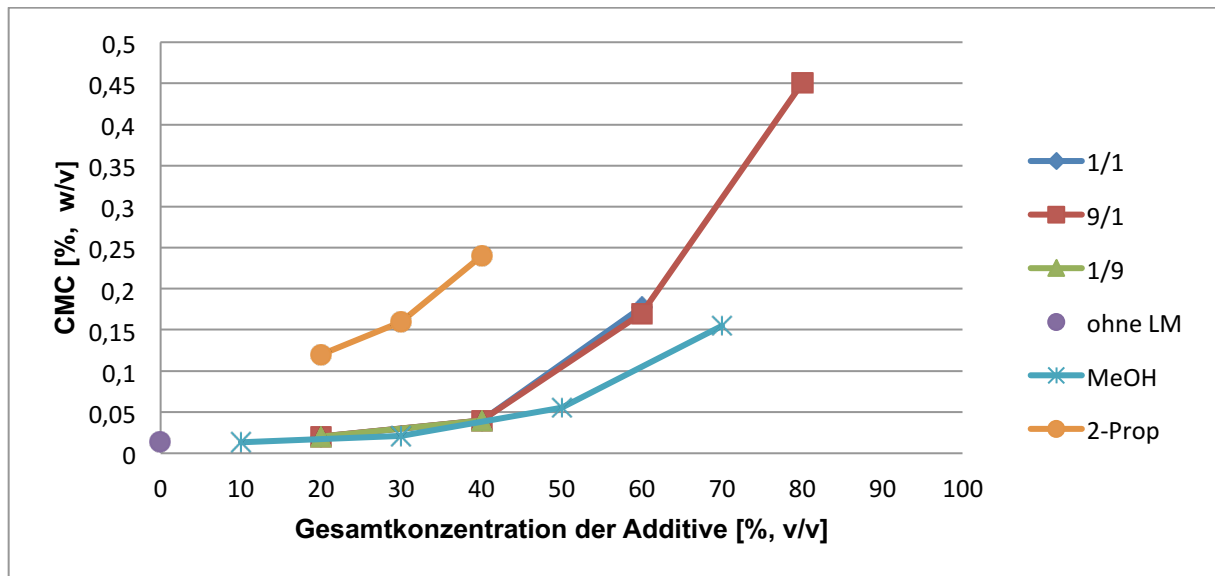


Abb. 15: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Methanol und 2-Propanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer Methanol/2-Propanol (v/v)) untersucht.

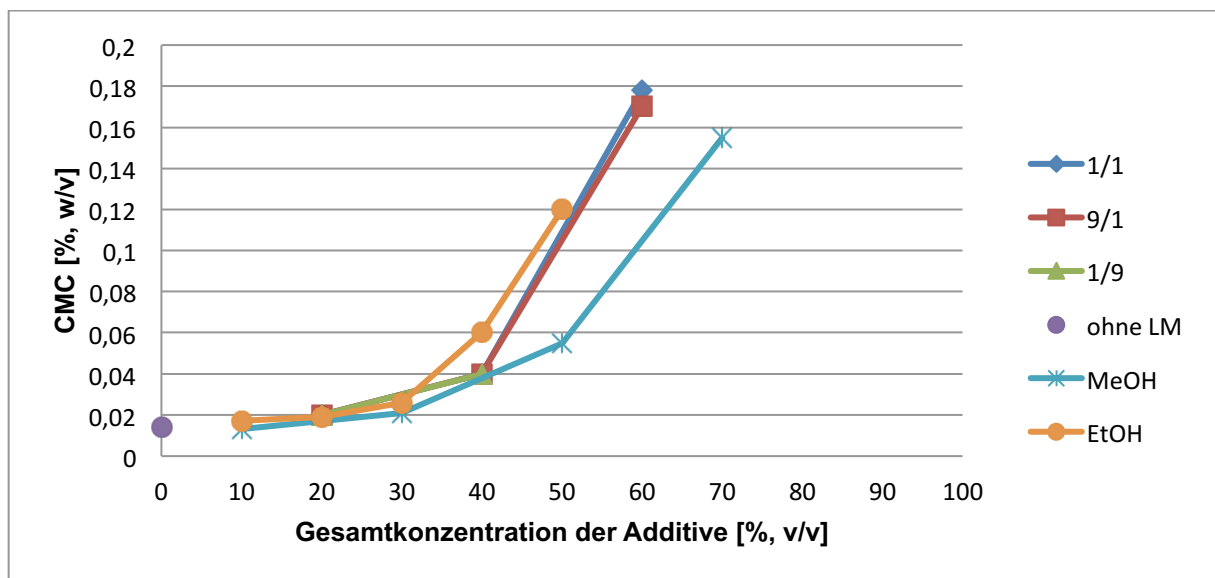


Abb. 16: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 in Anwesenheit von Methanol und Ethanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer Methanol/Ethanol (v/v)) untersucht.

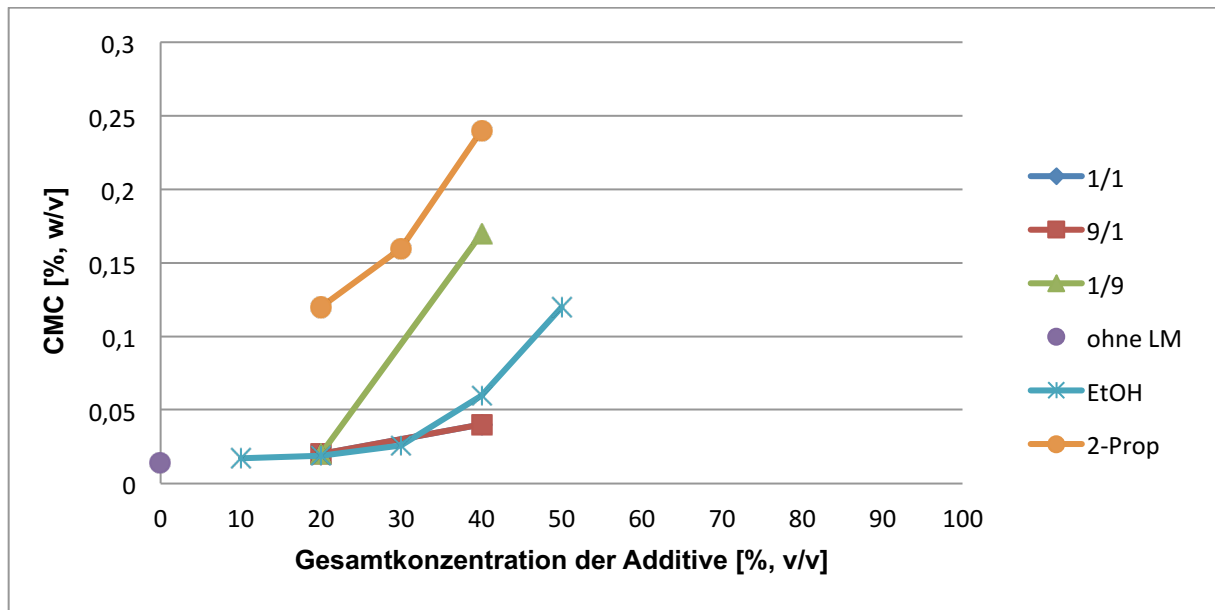


Abb. 17: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Ethanol und 2-Propanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer Ethanol/2-Propanol (v/v)) untersucht.

b) Beeinflussung der CMC durch chaotrope Additive

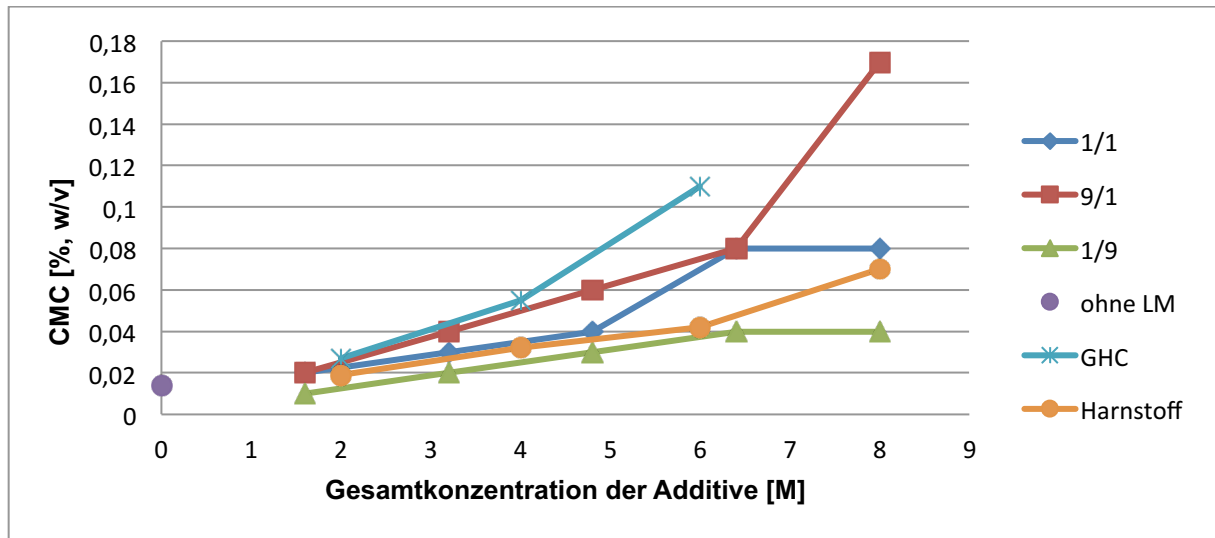


Abb. 18: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer Guanidiniumhydrochlorid/Harnstoff (v/v)) untersucht.

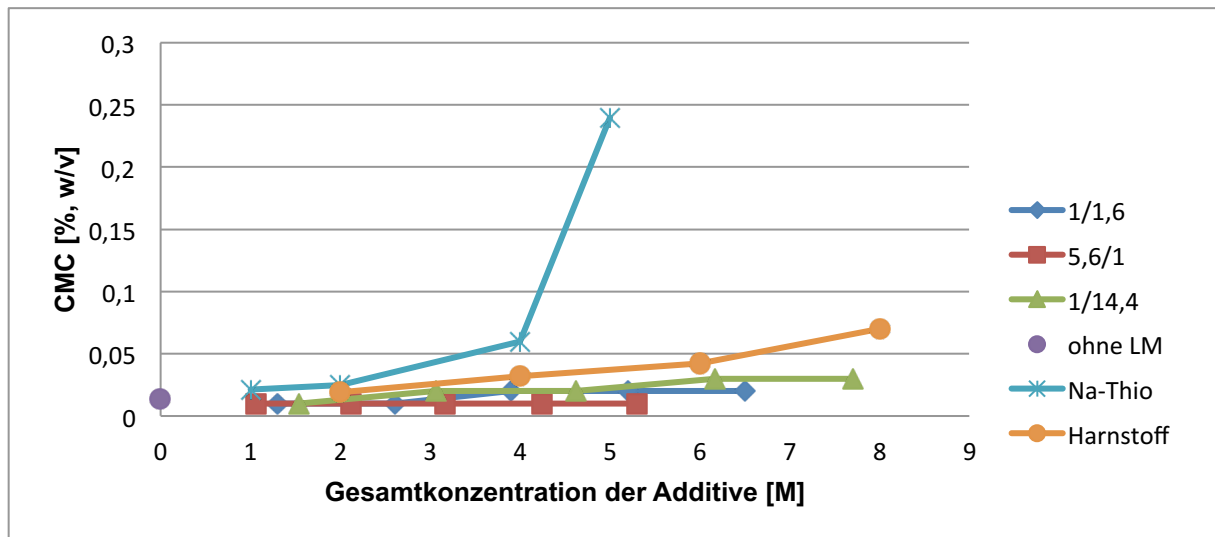


Abb. 19: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Natriumthiocyanat und Harnstoff bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer Natriumthiocyanat/Harnstoff (v/v)) untersucht.

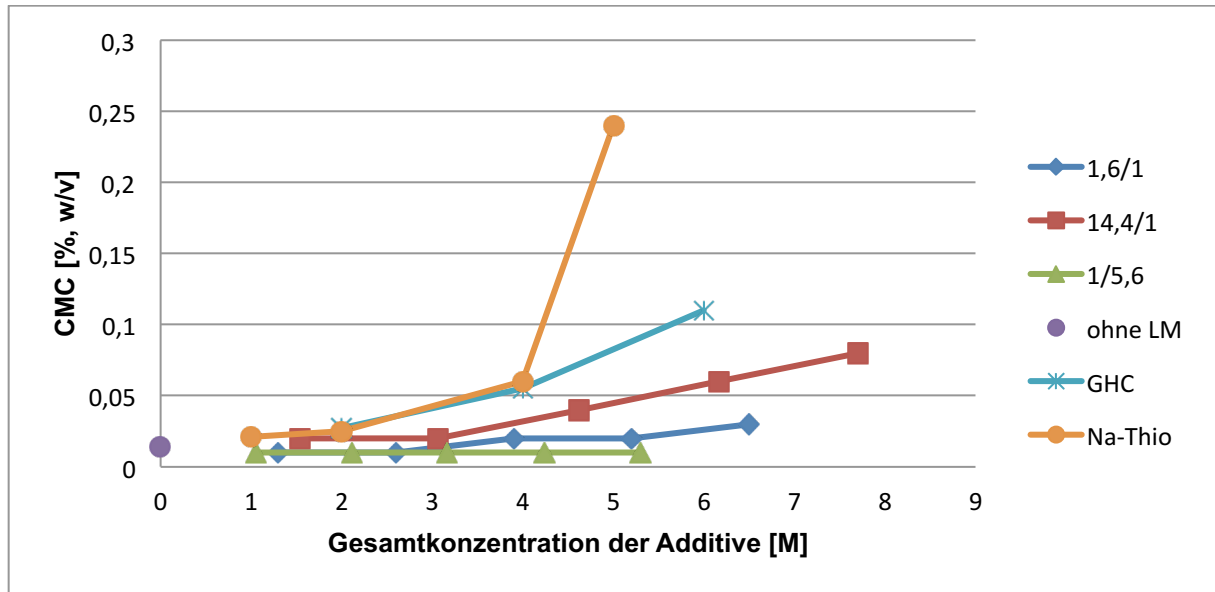


Abb. 20: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Guanidinhydrochlorid und Natriumthiocyanat bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Angaben immer Guanidinhydrochlorid/Natriumthiocyanat (v/v)) untersucht.

c) Beeinflussung der CMC durch Mischungen aus Lösungsmitteln und chaotropen Additiven

Für die folgenden Abbildungen wurden aufgrund unterschiedlicher Maßeinheiten der verwendeten Additive die Konzentrationen in Mol/L umgerechnet.

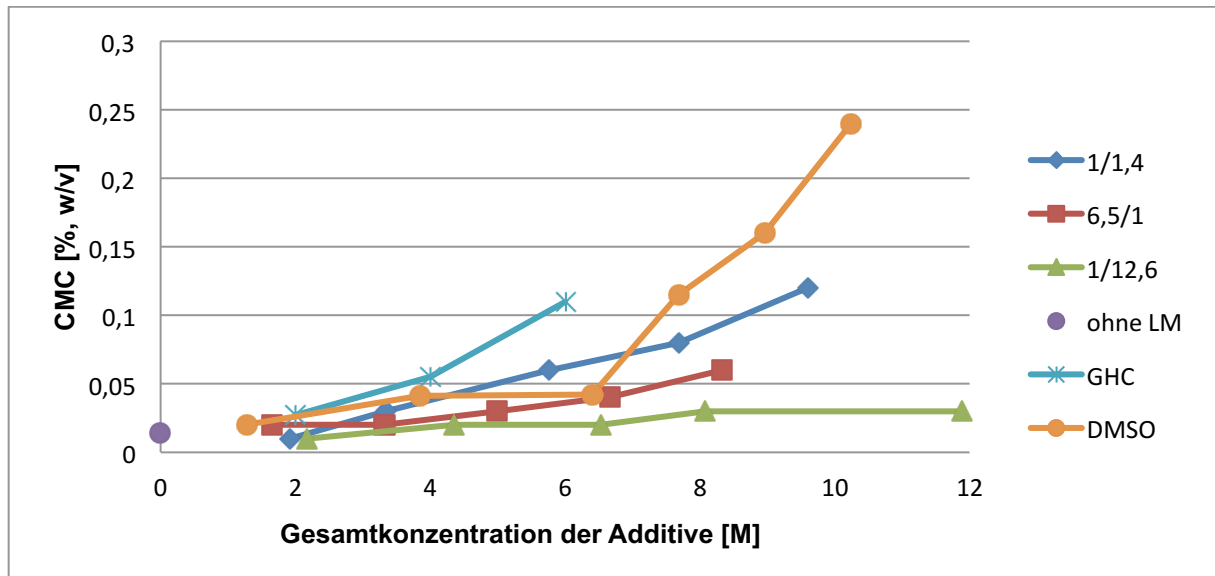


Abb. 21: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Guanidiniumhydrochlorid und DMSO bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Guanidiniumhydrochlorid/DMSO) untersucht.

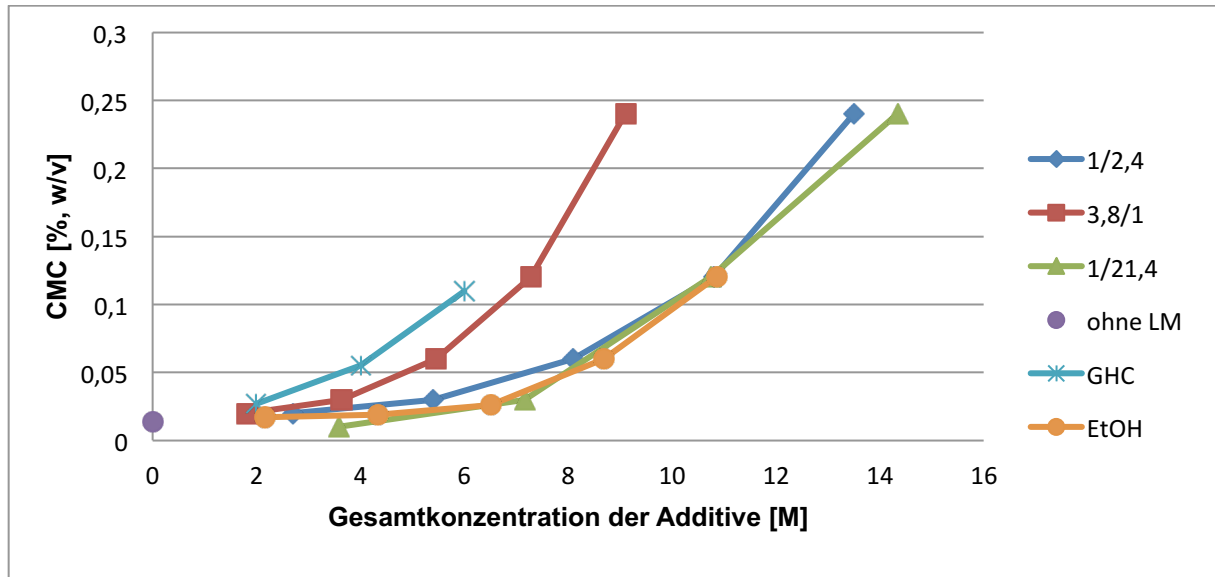


Abb. 22: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Guanidiniumhydrochlorid und Ethanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Guanidiniumhydrochlorid/Ethanol) untersucht.

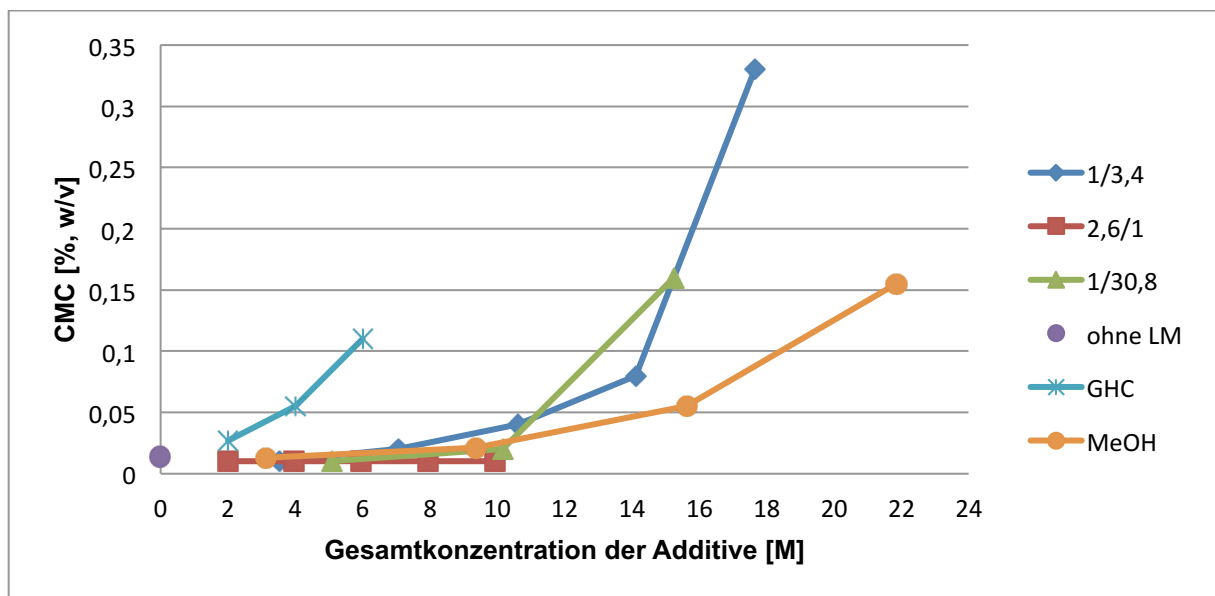


Abb. 23: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Guanidiniumhydrochlorid und Methanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Guanidiniumhydrochlorid/Methanol) untersucht.

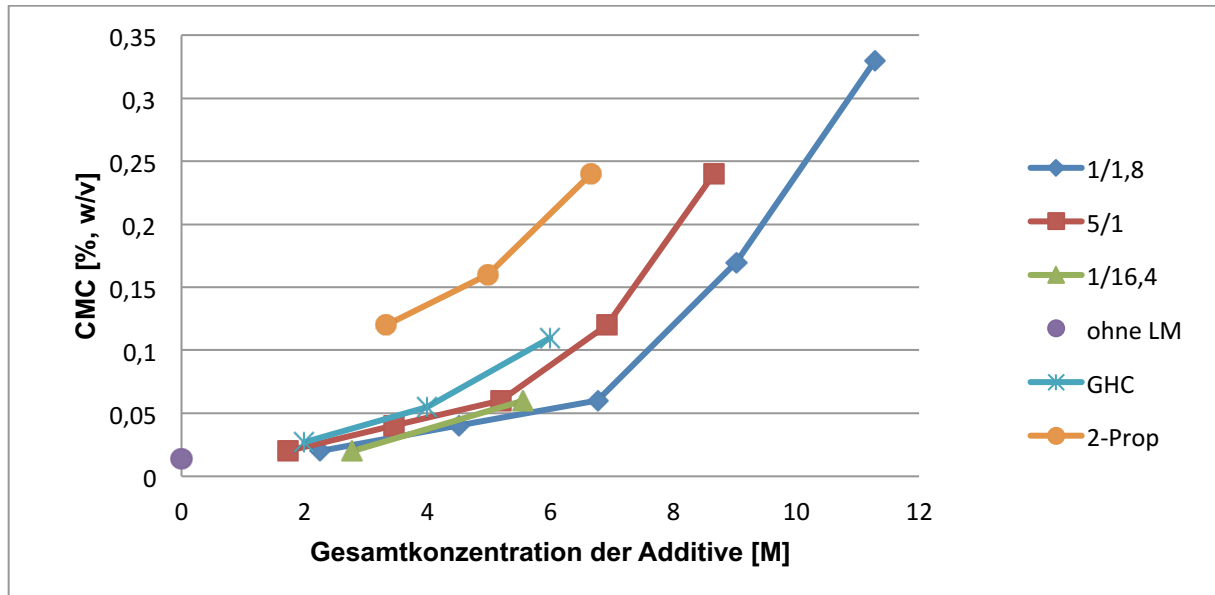


Abb. 24: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Guanidinhydrochlorid und 2-Propanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Guanidinhydrochlorid/2-Propanol) untersucht.

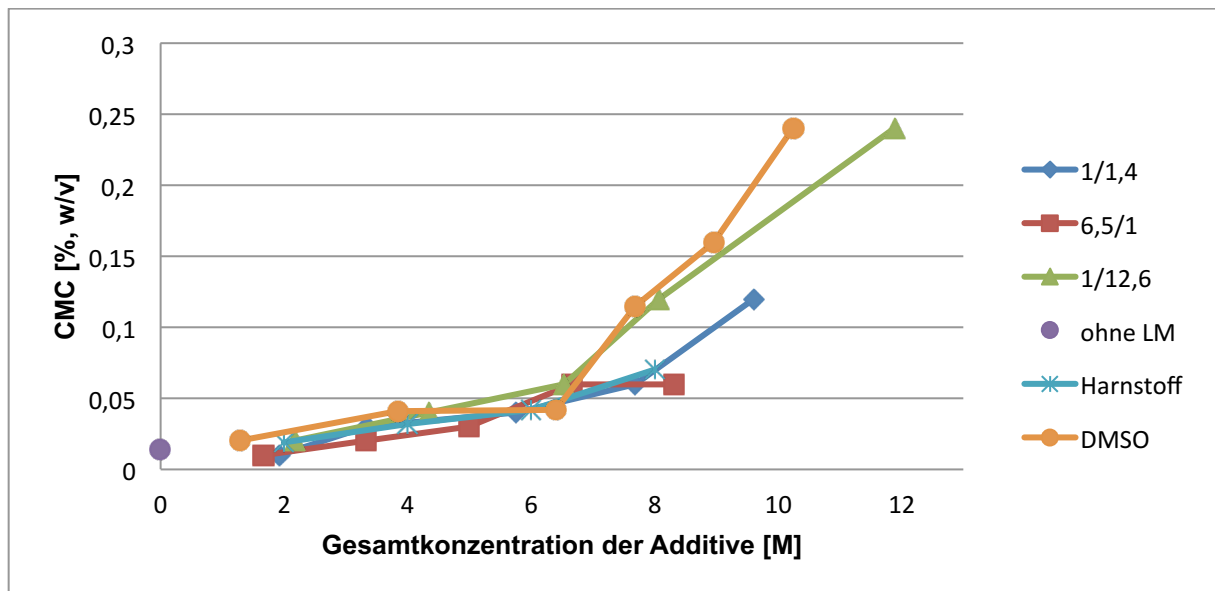


Abb. 25: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Harnstoff und DMSO bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Harnstoff/DMSO) untersucht.

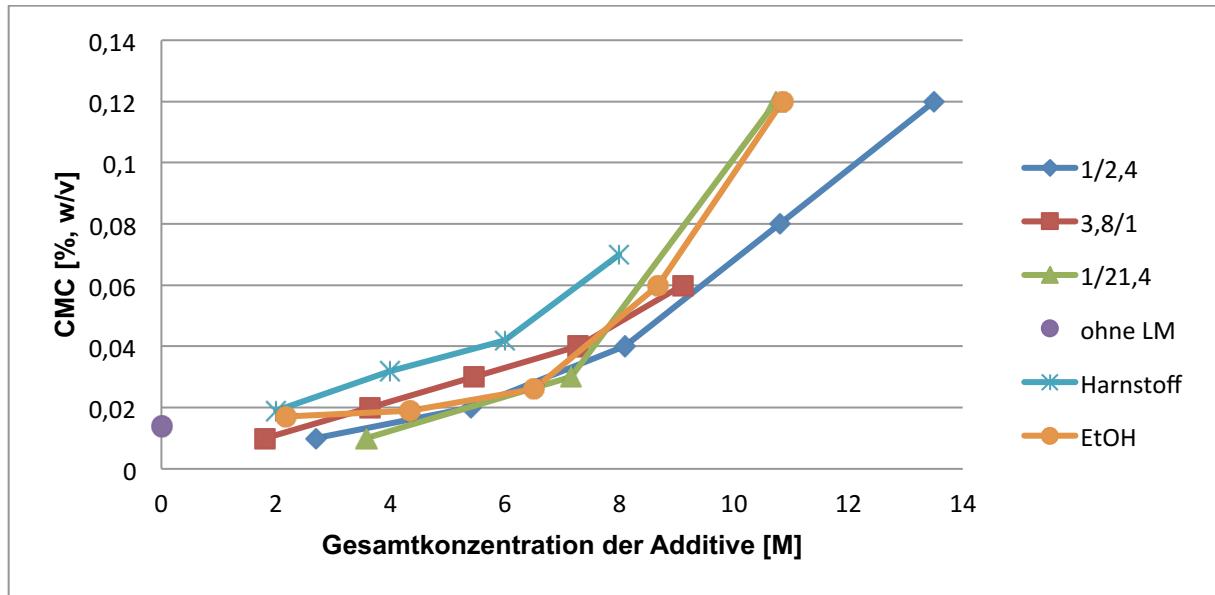


Abb. 26: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Harnstoff und Ethanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Harnstoff/Ethanol) untersucht.

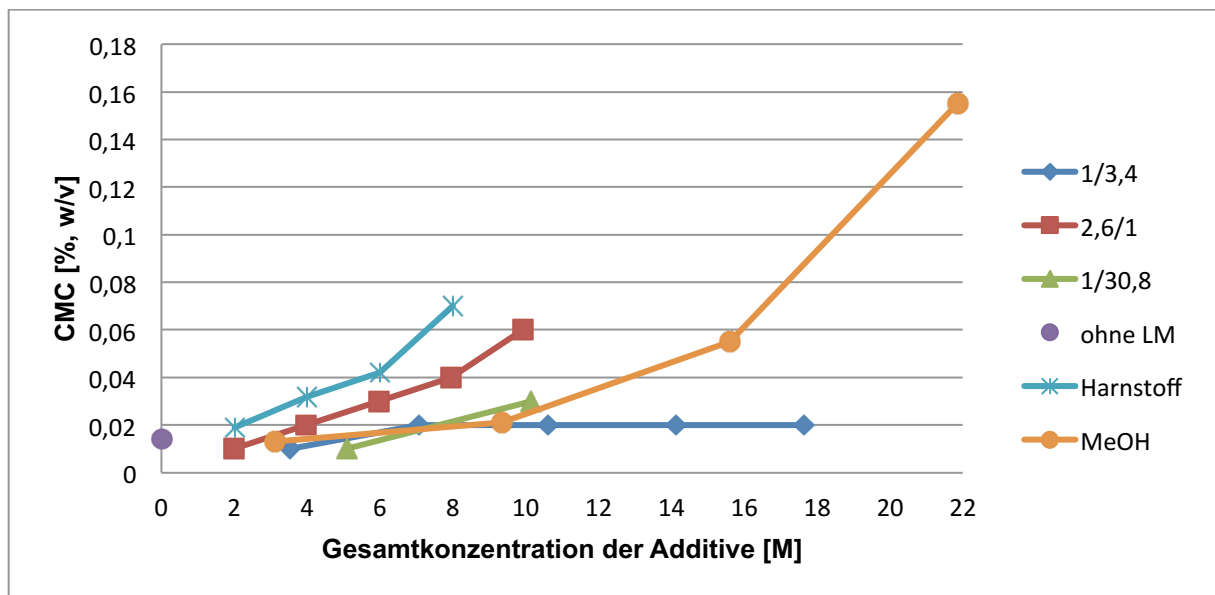


Abb. 27: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Harnstoff und Methanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Harnstoff/Methanol) untersucht.

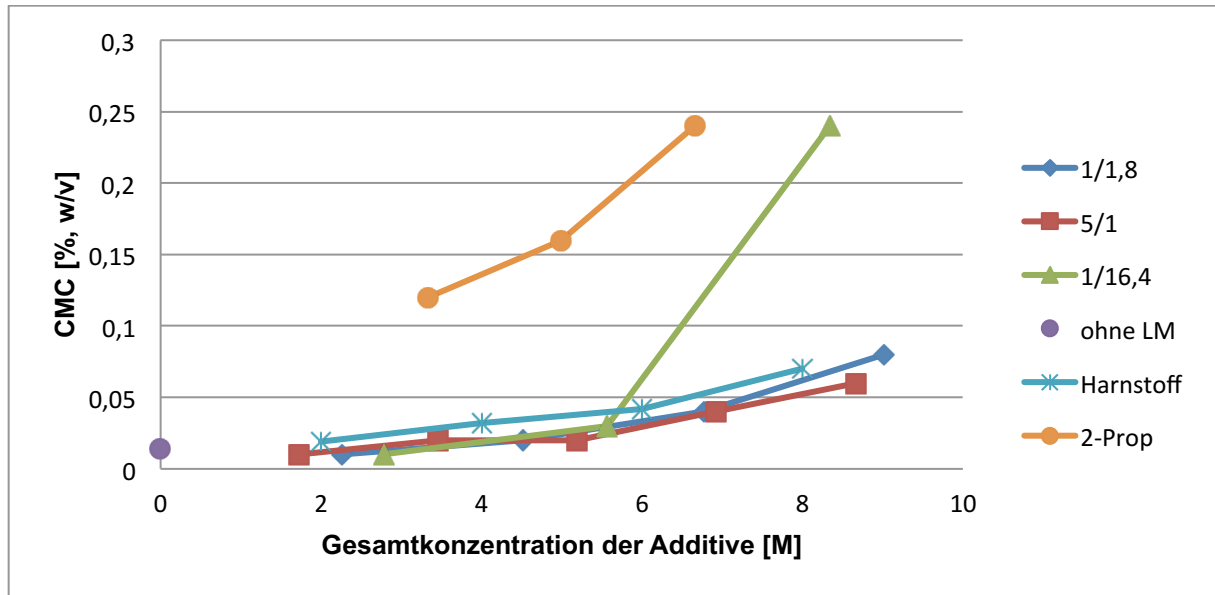


Abb. 28: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Harnstoff und 2-Propanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Harnstoff/2-Propanol) untersucht.

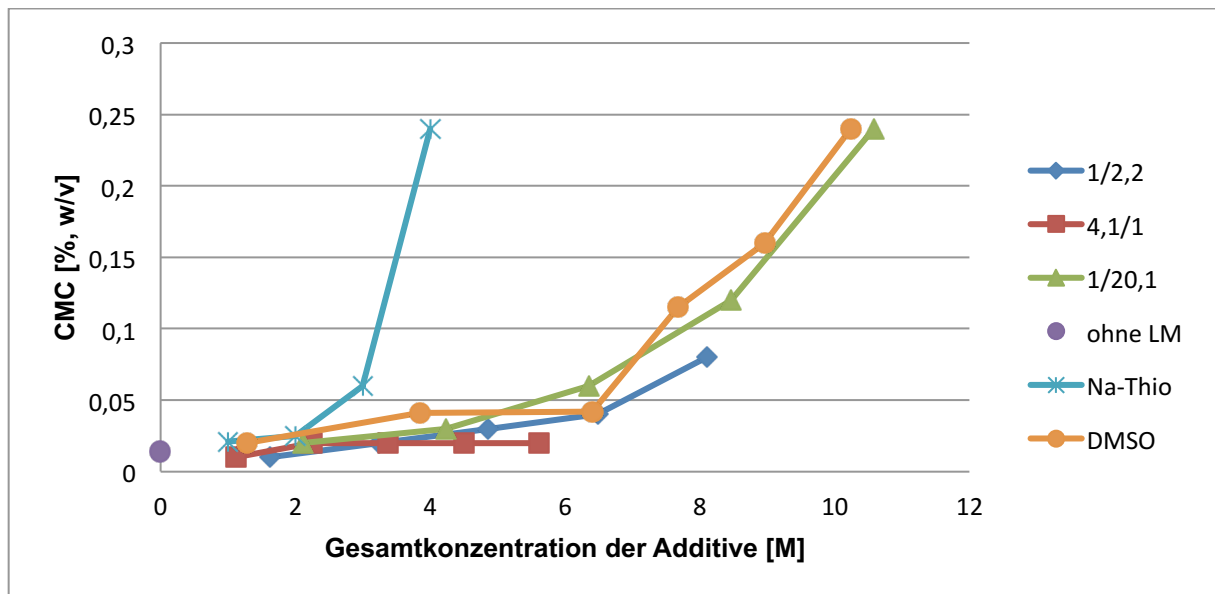


Abb. 29: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Natriumthiocyanat und DMSO bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Natriumthiocyanat/DMSO) untersucht.

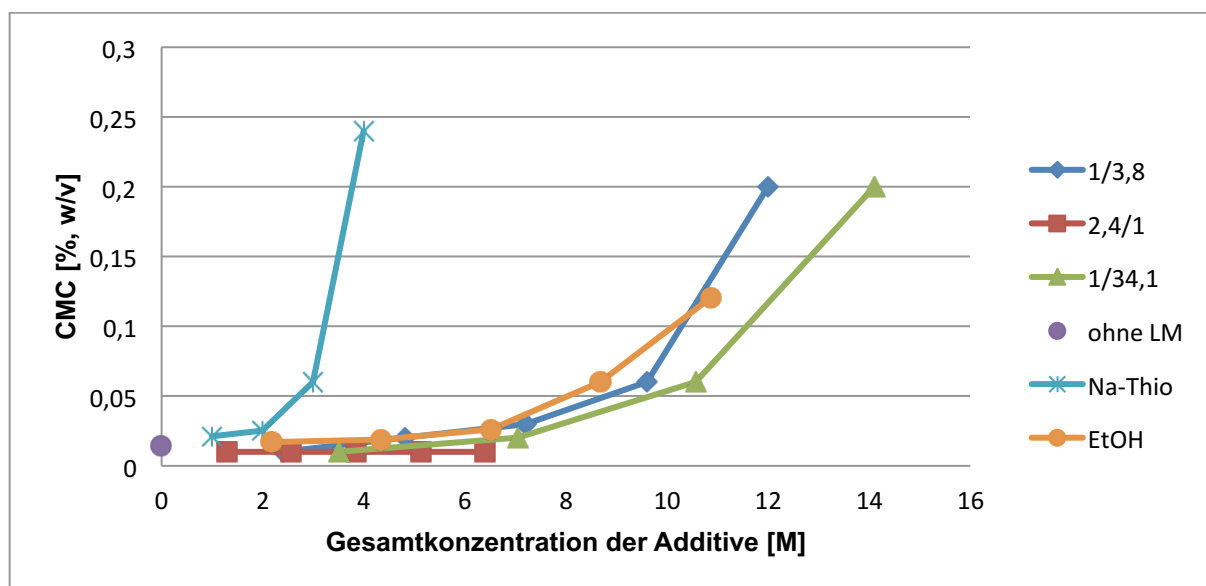


Abb. 30: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Natriumthiocyanat und Ethanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Natriumthiocyanat/Ethanol) untersucht.

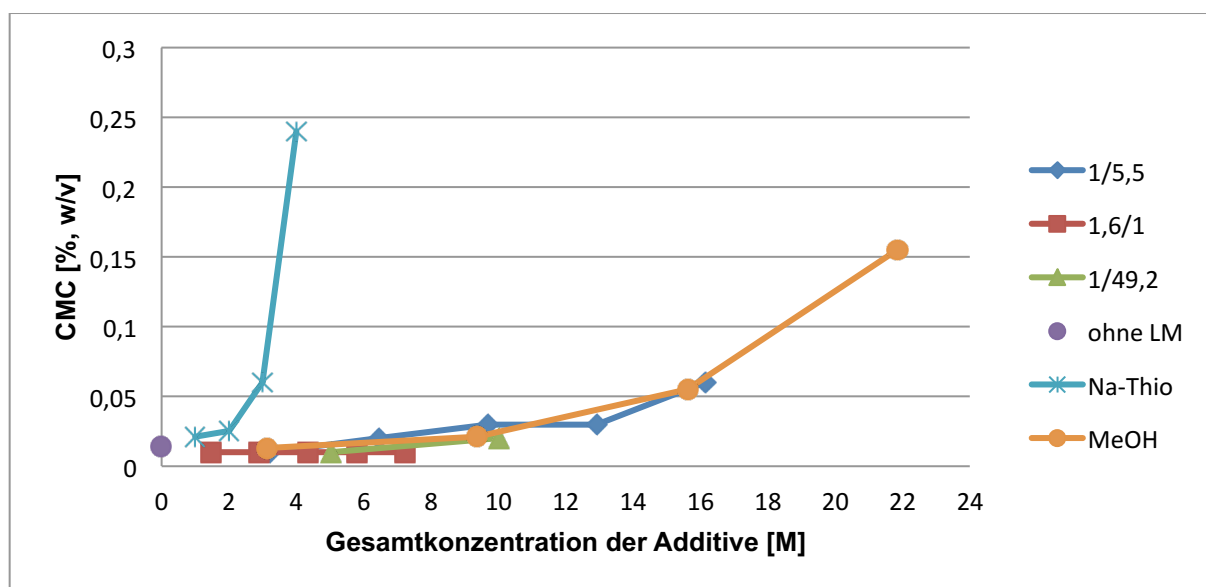


Abb. 31: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Natriumthiocyanat und Methanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Natriumthiocyanat/Methanol) untersucht.

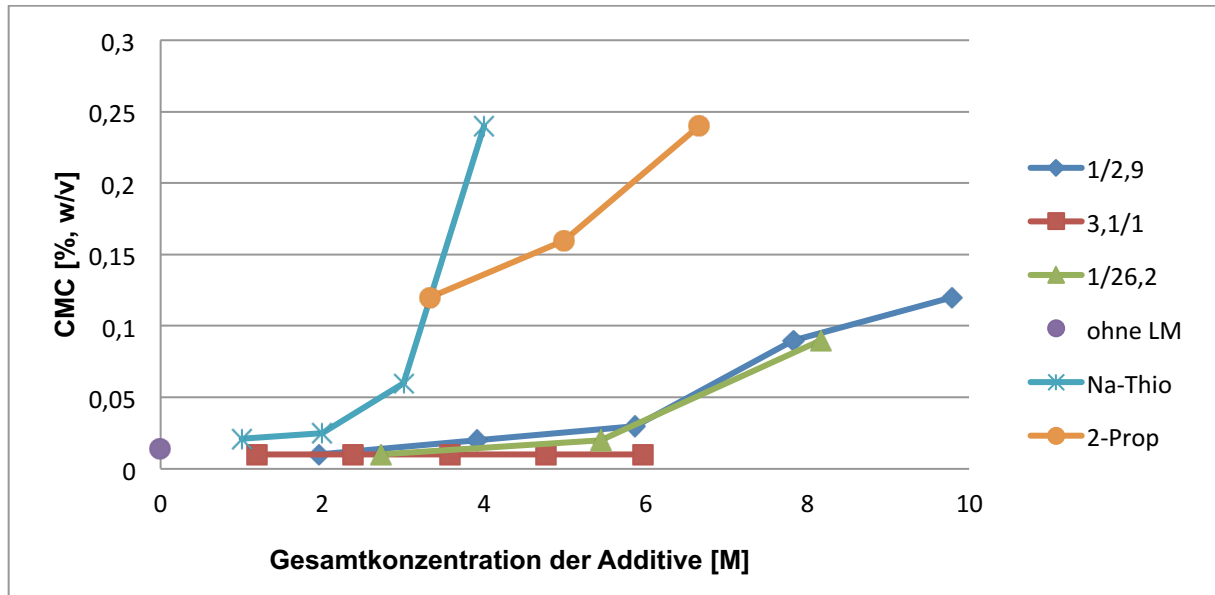


Abb. 32: Abhängigkeit der CMC von Triton X-100 von Natriumthiocyanat und 2-Propanol bei verschiedenen Konzentrationen. Die beiden Additive wurden sowohl einzeln als auch in verschiedenen kombinierten Konzentrationsverhältnissen (Natriumthiocyanat/2-Propanol) untersucht.

Wie zu erwarten war, haben die verschiedenen Kombinationen von Additiven unterschiedliche Effekte auf die CMC. Einzelne Kombinationen waren in der Lage die CMC drastisch zu erhöhen. Das war aber nur bei sehr hohen Konzentrationen der Lösungsmittel möglich. Die Tab. 1-3 zeigen die niedrigsten Additivkombinationen, die dennoch die CMC stark erhöhen.

Additive		Konzentration [%]		CMC [%w/v]	Vielfaches CMC (im Vergleich zur CMC ohne Additiv)
A1	A2	A1	A2		
DMSO	MeOH	30	30	0,08	5,7
DMSO	EtOH	30	30	0,17	12,1
		40	40	0,24	17,1
MeOH	EtOH	30	30	0,17	12,1

Tab. 1: CMC-Werte unter Anwesenheit zweier organischer Lösungsmittel in jeweils unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen.

Additive		Konzentration [M]		CMC [% w/v]	Vielfaches CMC (im Vergleich zur CMC ohne Additiv)
A1	A2	A1	A2		
GHC	Harnstoff	2,4	2,4	0,04	2,9
		2,88	0,32	0,04	2,9

Tab. 2: CMC-Werte unter Anwesenheit zweier chaotroper Additive in jeweils unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen.

Additive		Konzentration [M]	Konzentration [%]	CMC [% w/v]	Vielfaches CMC (im Vergleich zur CMC ohne Additiv)
A1	A2	A1	A2		
GHC	DMSO	2,4	2,25	0,06	4,3
Harnstoff	EtOH	0,48	47,25	0,12	8,6
Harnstoff	2-Prop	0,48	47,25	0,24	17,1
Na-Thio	2-Prop	2	35	0,09	6,4

Tab. 3: CMC-Werte unter Anwesenheit organischer Lösungsmittel und chaotroper Additive in jeweils unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen.

6.1.3. Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse in Anwesenheit von verschiedenen Additiven

Aufgrund der vielversprechenden Erhöhung der CMC durch Methanol, Ethanol, 2-Propanol, DMSO, Harnstoff und Guanidinhydrochlorid wurden diese Zusätze hinsichtlich ihres Effektes auf die Dialyseeffizienz zur Entfernung von Triton X-100 untersucht. Zunächst wurde dies mit einzelnen Additiven durchgeführt, danach mit Kombinationen.

In Anwesenheit von Methanol, Ethanol, Guanidinhydrochlorid und Harnstoff ist der Anteil an aus der Probe entferntem Triton X-100 zu jedem Zeitpunkt wesentlich höher als ohne Zusatz (Abb. 33-38). So waren beispielsweise nach 72 Stunden 97,9% des Triton X-100 mit Zusatz von 50%igem Methanol und 98,9% bei 4 M Guanidinhydrochlorid aus der Probe entfernt. Die weitere Erhöhung der Konzentration der einzelnen Additive brachte keine wesentliche Veränderung (98,5% bei 6 M Harnstoff und 98,6% bei 8 M Harnstoff). Die höchste Effizienz wurde mit 70% Methanol und 8 M Harnstoff erreicht.

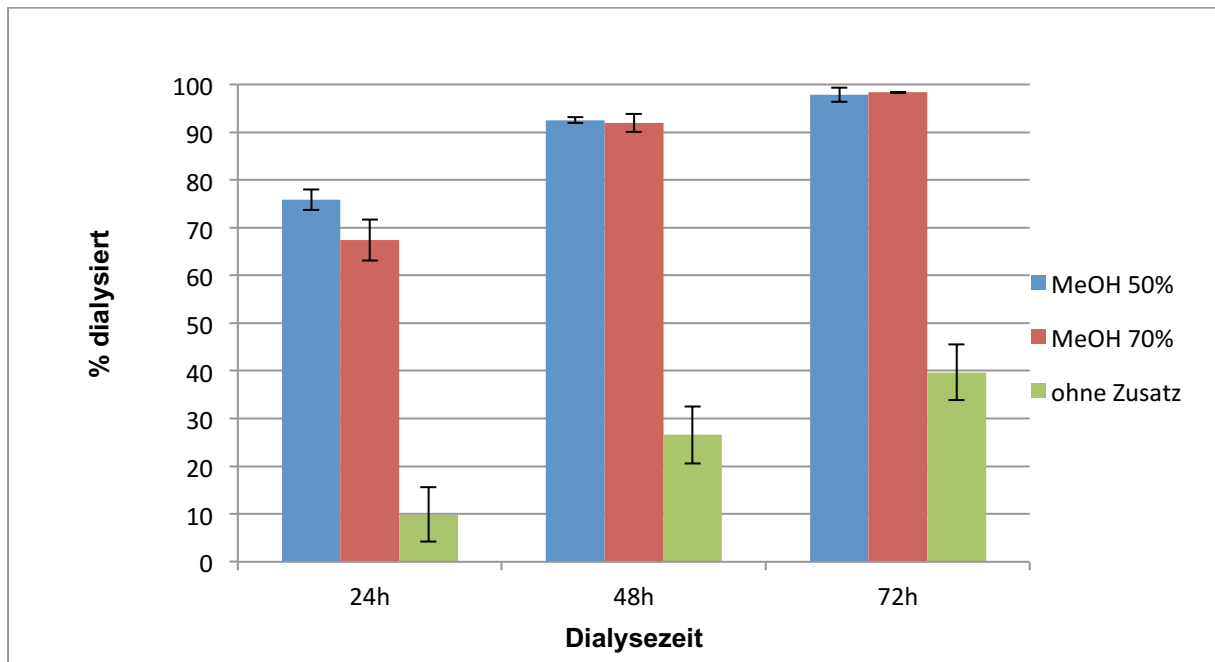


Abb. 33

Abb. 33-38: Rate des mittels Dialyse entfernten Triton X-100. Die Angaben in allen Abbildungen wurden nach der folgenden Gleichung berechnet:

$R = 100\% \cdot (Ca - Ce) / Ca$ mit R: Rate, Ca: Anfangskonzentration, Ce: Endkonzentration von Triton X-100 und stellen Mittelwerte \pm SD mit $n=3$ dar. 100 μ l 0,5% Triton X-100 in Puffer A wurden ohne und in Anwesenheit der in den Abb. 34-39 gezeigten Additiva für 24, 48 und 72 Stunden unter Verwendung der Mikrodialysatoren MD-100 dialysiert. Das Wechselintervall betrug 24 Stunden.

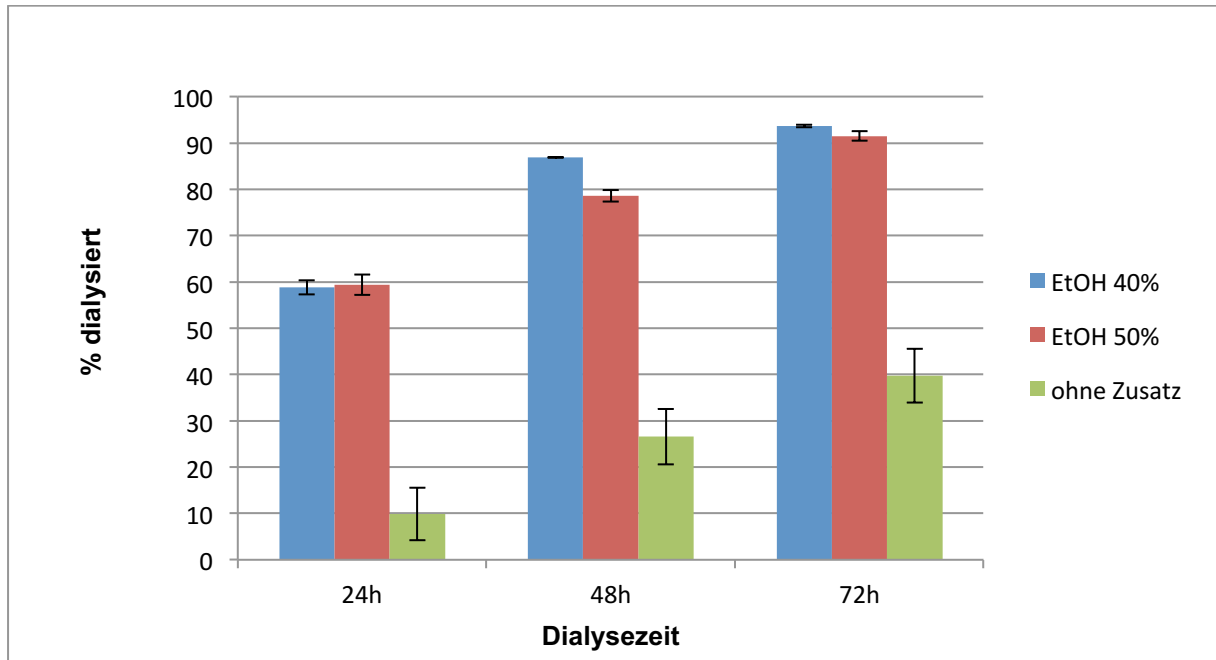


Abb. 34

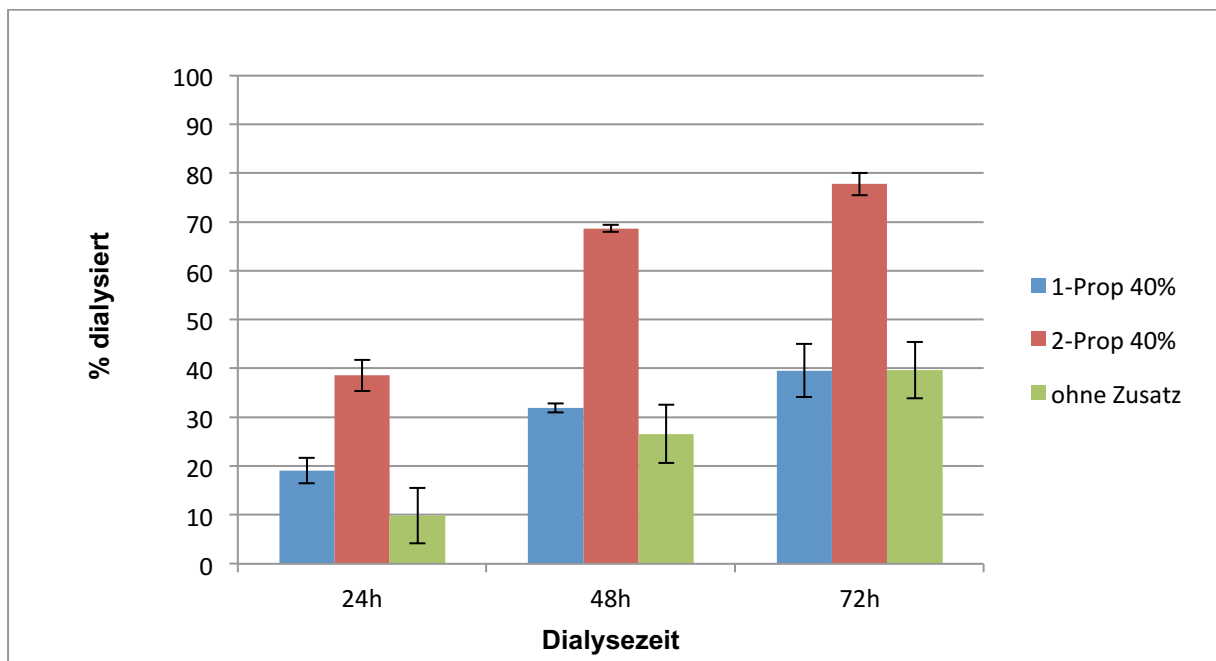


Abb. 35

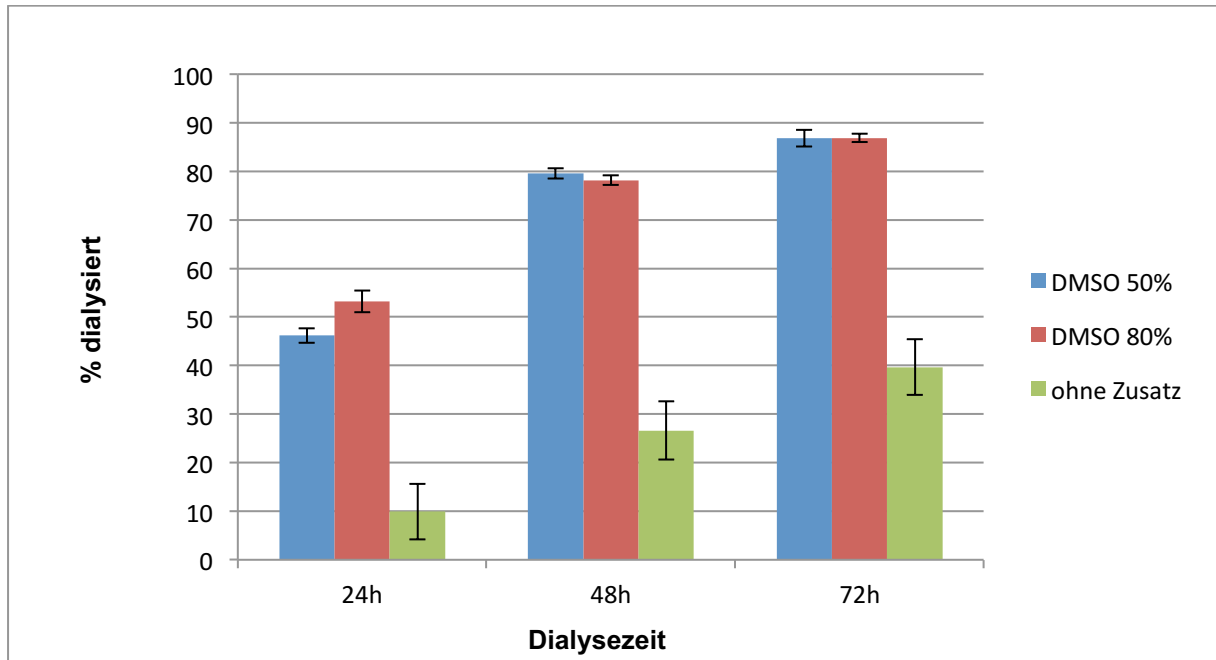


Abb. 36

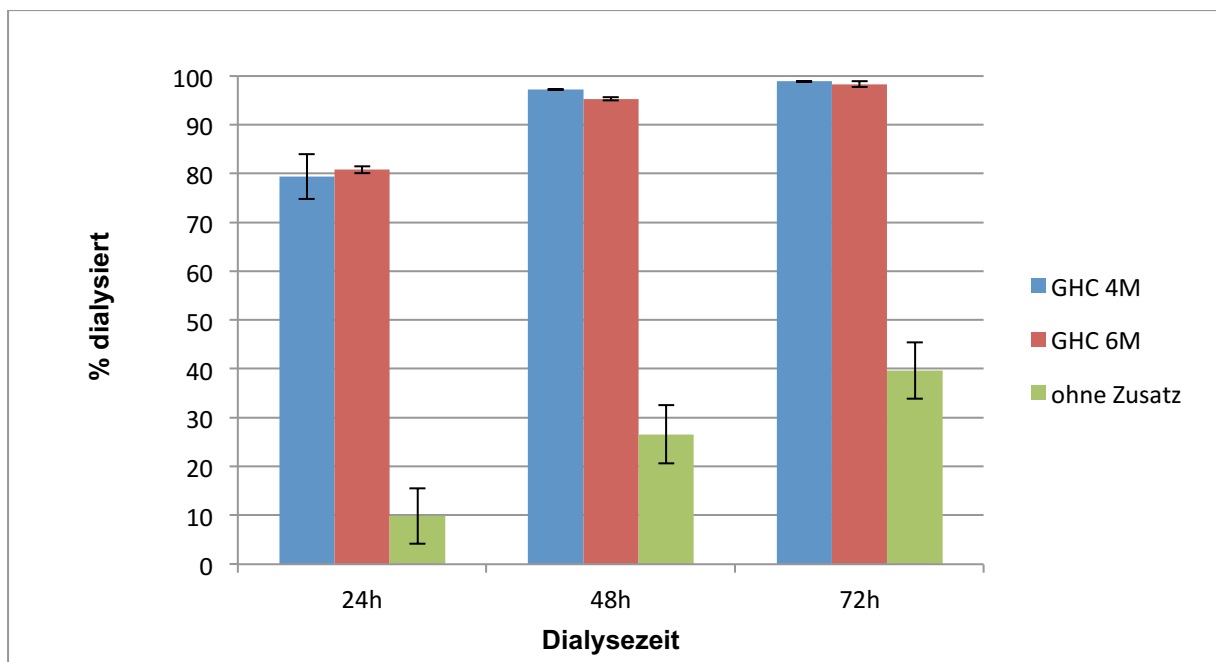


Abb. 37

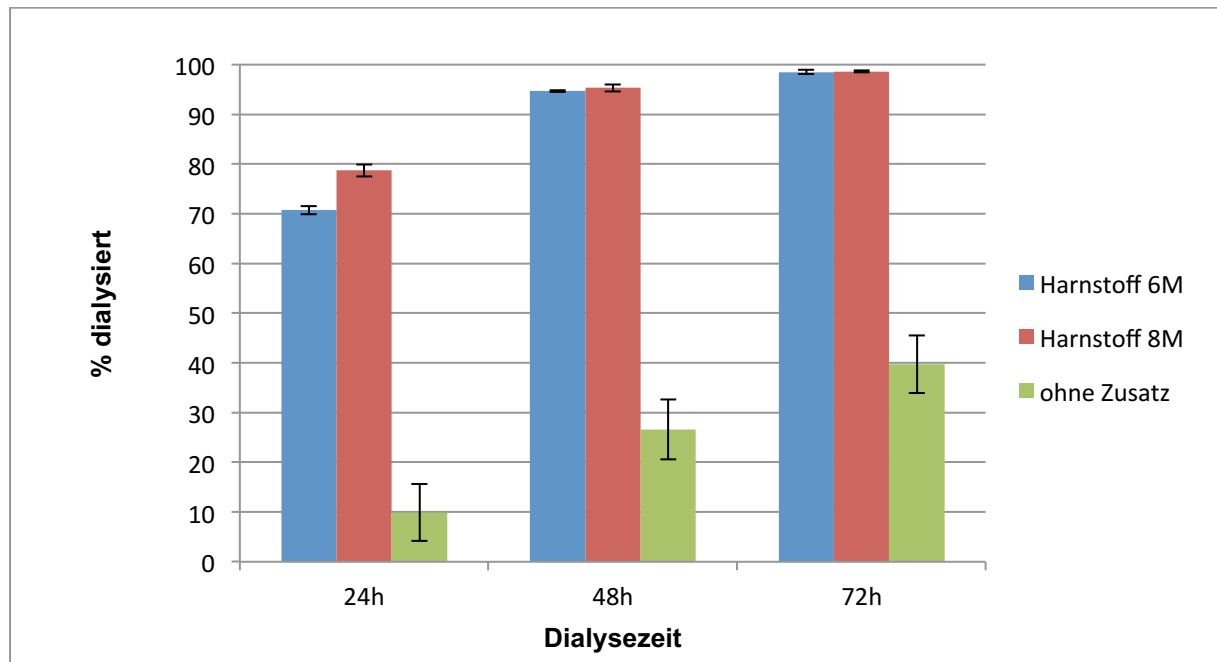


Abb. 38

Da für die spätere Anwendung auch die Stabilitäts- und Löslichkeitsanforderungen der zu untersuchenden Proteine berücksichtigt werden müssen, wurde geprüft, ob Kombinationen von Zusätzen bei geringeren Konzentrationen der einzelnen Additive vergleichbare Dialyseeffizienzen erbringen. Hierbei wurden beispielhaft die Kombinationen aus Methanol und Ethanol bei einer Gesamtkonzentration an Lösungsmittel von 60% sowie verschiedene Mischungen aus Methanol und Guanidinhydrochlorid untersucht. Die Dialyseraten mit beiden einzelnen Lösungsmitteln und den Kombinationen liegen unerwartet dicht beieinander, obwohl sich die gefundenen CMC bis zum 2,5-fachen unterscheiden (Tab. 4).

Verhältnis MeOH/EtOH	1/0	1/9	1/1	9/1	0/1
Rate nach 48 h	98,6% ± 0,2%	96,2% ± 0,4%	96,9% ± 0,3%	98,4% ± 0,4%	96,1% ± 0,5%
Rate nach 72 h	99,9% ± 0,1%	98,5% ± 0,5%	99,1% ± 0,4%	99,5% ± 0,3%	98,8% ± 0%
CMC von Triton X-100 [% w/v]	0,1	0,25	0,17	0,17	0,18

Tab. 4: CMC und Rate des mittels Dialyse entfernten Triton X-100 bei Gesamtkonzentration der Lösungsmittel von 60% (v/v) und Wechsel des Außenmediums alle 24 Stunden. Die Angaben in der Tabelle wurden entsprechend der Gleichung unter 6.1.3 Abb. 33-38 berechnet.

Bei Kombinationen aus Methanol und Guanidinhydrochlorid (Abb. 40) wird meist eine geringfügig höhere Effizienz der Entfernung von Triton X-100 erreicht als mit den untersuchten reinen Lösungsmittelkombinationen aus Methanol und Ethanol (Abb. 39).

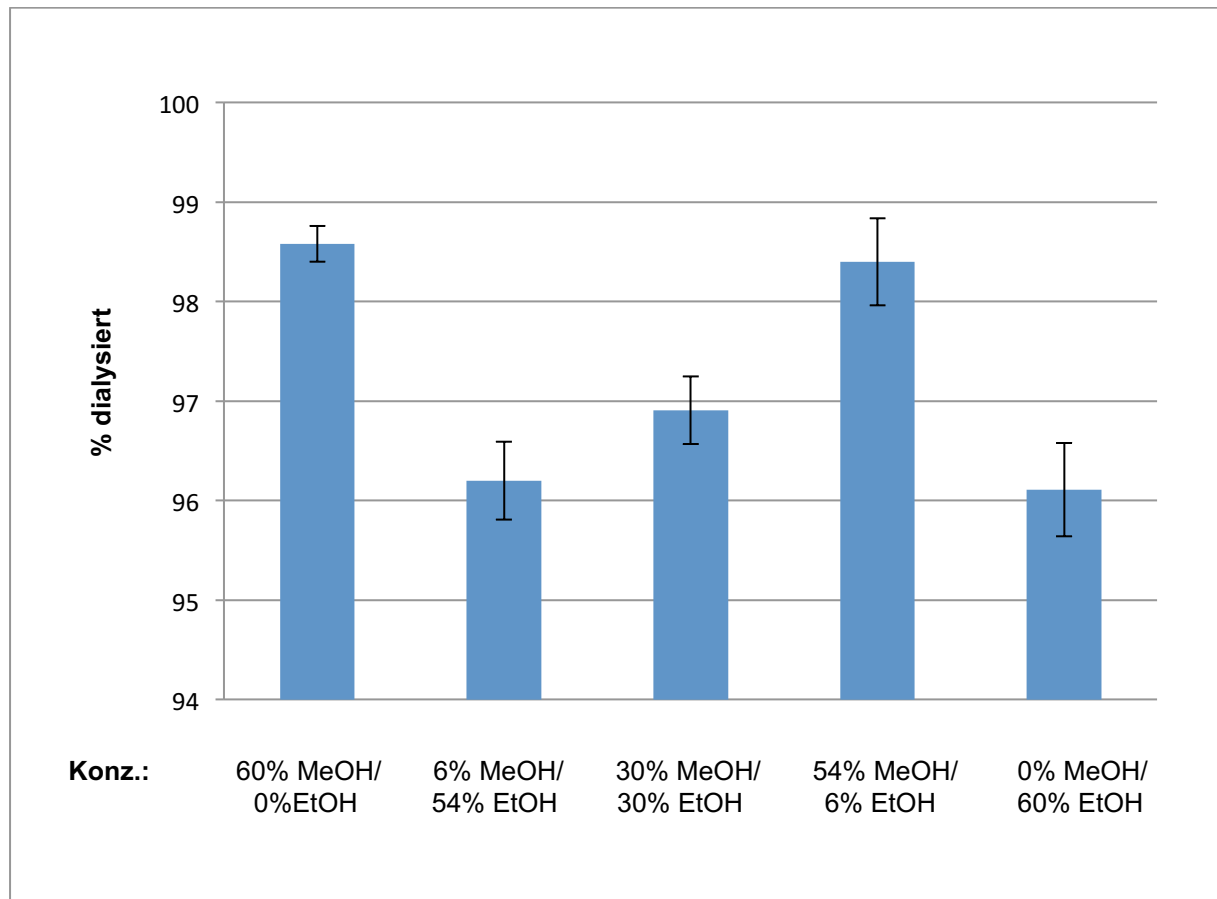


Abb. 39: Grafische Darstellung der Rate des mittels Dialyse entfernten Triton X-100. Die Angaben in der Grafik wurden entsprechend der Gleichung unter 6.1.3 Abb. 33-38 berechnet. 100 µl 0,5% Triton X-100 in Puffer A wurden in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Methanol und Ethanol für 48 Stunden unter Verwendung der Mikrodialysatoren MD-100 dialysiert. Das Außenmedium wurde nach 24 Stunden gewechselt.

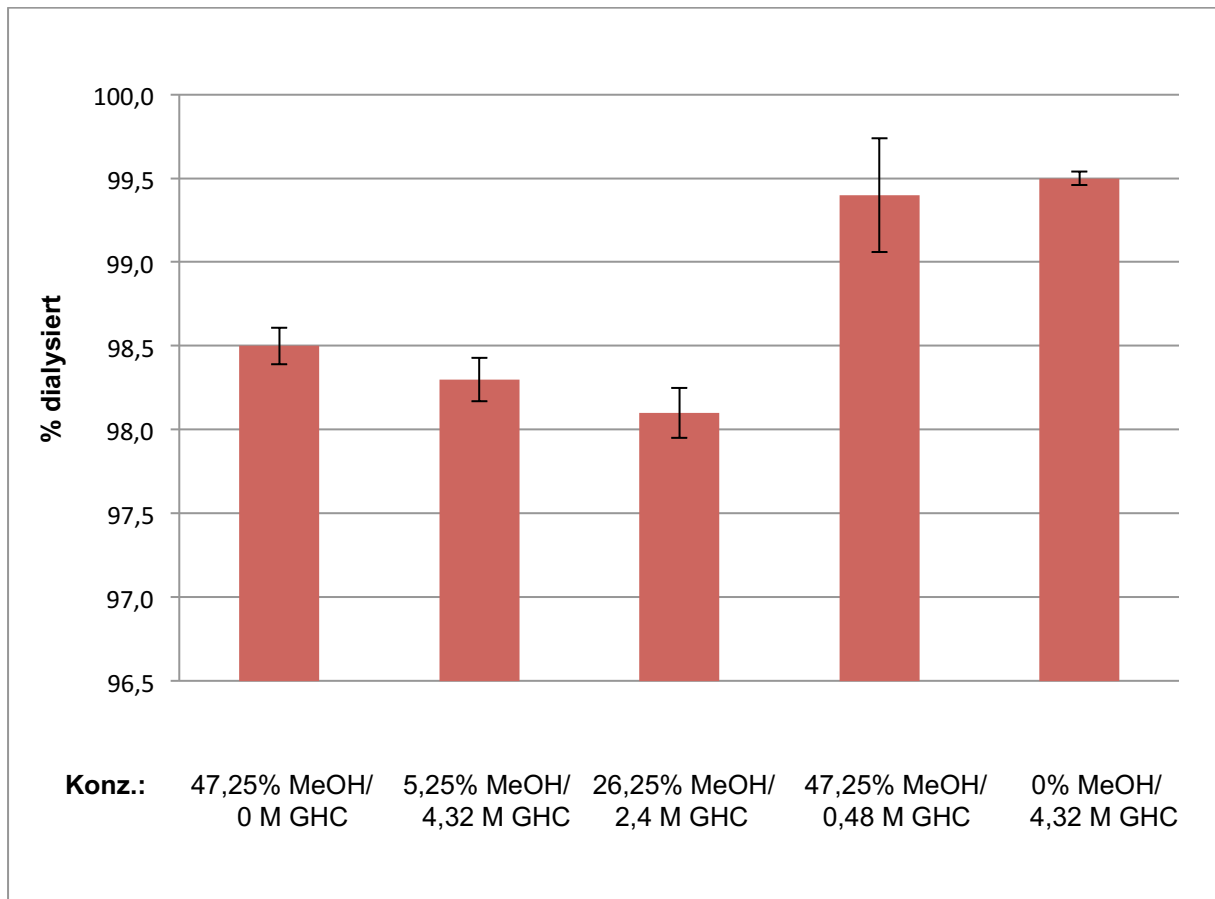


Abb. 40: Grafische Darstellung der Rate des mittels Dialyse entfernten Triton X-100. Die Angaben in der Grafik wurden entsprechend der Gleichung unter 6.1.3 Abb. 33-38 berechnet. 100 µl 0,5% Triton X-100 in Puffer A wurden in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Methanol und Guanidiniumhydrochlorid für 48 Stunden unter Verwendung der Mikrodialysatoren MD-100 dialysiert. Das Außenmedium wurde nach 24 Stunden gewechselt.

Bei der Dialyse in Anwesenheit von Guanidiniumhydrochlorid allein waren bereits nach 48 Stunden 99,4% des Triton X-100 aus der Probe entfernt. Dieser Wert konnte mit der Kombination Methanol/Guanidiniumhydrochlorid nur unwesentlich weiter verbessert werden.

6.1.4. Einfluss der Temperatur auf die Dialyse

Wie erwartet steigt die Dialyseeffizienz mit steigender Temperatur in Anwesenheit von zwei ausgewählten Additiven. Mit Ethanol ist eine stärkere Temperaturabhängigkeit zu erkennen. Mit der untersuchten Ethanolkonzentration wurden oberhalb einer Temperatur von 20°C höhere Dialyseraten als mit 4 M Harnstoff erzielt, obwohl Harnstoff bei 6°C das effizientere Additiv war (Abb. 41).

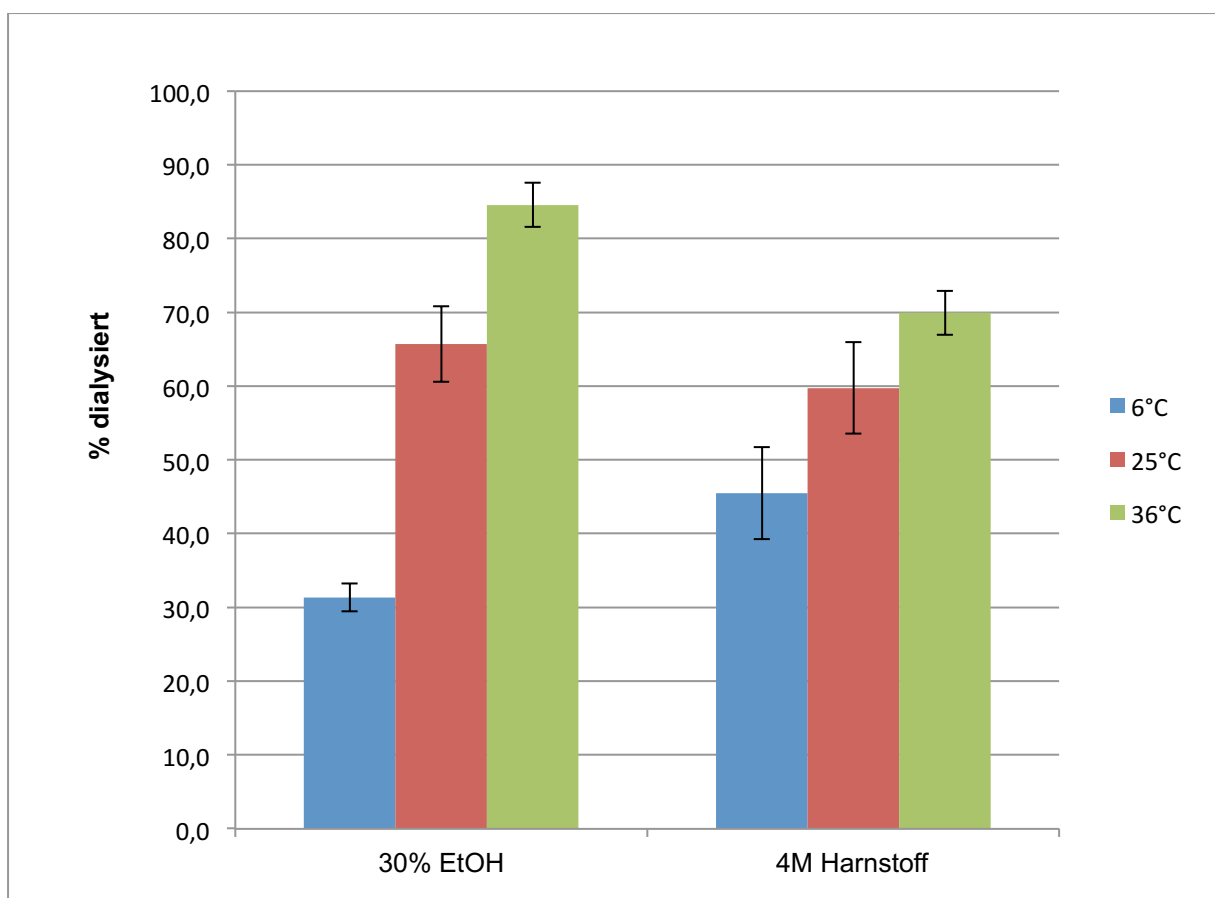


Abb. 41: Rate des mittels Dialyse entfernten Triton X-100 nach 24 Stunden Dialyse in Anwesenheit von Ethanol beziehungsweise Harnstoff (Mittelwert \pm SD, n=3) bei verschiedenen Temperaturen. 100 μ l 0,5% Triton X-100 in Puffer A wurden in Anwesenheit von 30% Ethanol und 4 M Harnstoff für 24 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (6°C, 25°C, 36°C) unter Verwendung der Mikrodialysatoren MD-100 dialysiert.

6.1.5. Proteinwiederfindung

Die Wiederfindungen von Rinderserumalbumin in Anwesenheit von Triton X-100 (0,01% und 0,1%; w/v) in Puffer A lagen im Mittel um 100%. Die Proteinwiederfindung ist bei den untersuchten Bedingungen unabhängig von der Triton X-100-Konzentration. Lediglich bei kleinen Detergenskonzentrationen wird etwas weniger gefunden (Tab. 5).

BSA-Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung BSA bei 0,1% Triton X-100-Zusatz [%]	Wiederfindung BSA bei 0,01% Triton X-100-Zusatz [%]
1	98,2 ± 2,1	98,8 ± 2,6
0,5	105,0 ± 2,9	102,7 ± 3,4
0,25	108,8 ± 1,5	108,2 ± 2,0
0,01	106,0 ± 3,6	104,9 ± 5,9
0,05	81,4 ± 1,6	85,7 ± 8,1

Tab. 5: Wiederfindung von Rinderserumalbumin aus einer BSA-Verdünnungsreihe sowie konstantem Zusatz von 0,1% (w/v) Triton X-100 beziehungsweise 0,01% (w/v) Triton X-100 nach Absorbanzmessung bei 562 nm (BCA).

5.1.6. Stabilität der Phycobilin-Fluoreszenz

Die Fluoreszenzintensitäten von Allo-Phycocyanin und C-Phycocyanin waren nach drei Tagen Lagerung in Puffer B im Vergleich zu den Fluoreszenzintensitäten vor der Inkubation, sowohl ohne als auch mit 5 M Harnstoff, auf ein Zehntel abgesunken. Eine Verschiebung der Fluoreszenzmaxima konnte nach Messung der

Anregungs- und Emissionsspektren der Proteine Allo-Phycocyanin und C-Phycocyanin ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenzintensitäten von B-Phycoerythrin, R-Phycoerythrin und R-Phycoerythrin 2 sind jedoch unter den untersuchten Bedingungen stabil. Unabhängig von den Lagerungstemperaturen (8°C und 25°C) waren die Fluoreszenzintensitäten für die Proben mit 5 M Harnstoff jedoch niedriger. Dies war auch bei den Kalibrationsreihen ohne Inkubationszeit zu erkennen (Abb. 42).

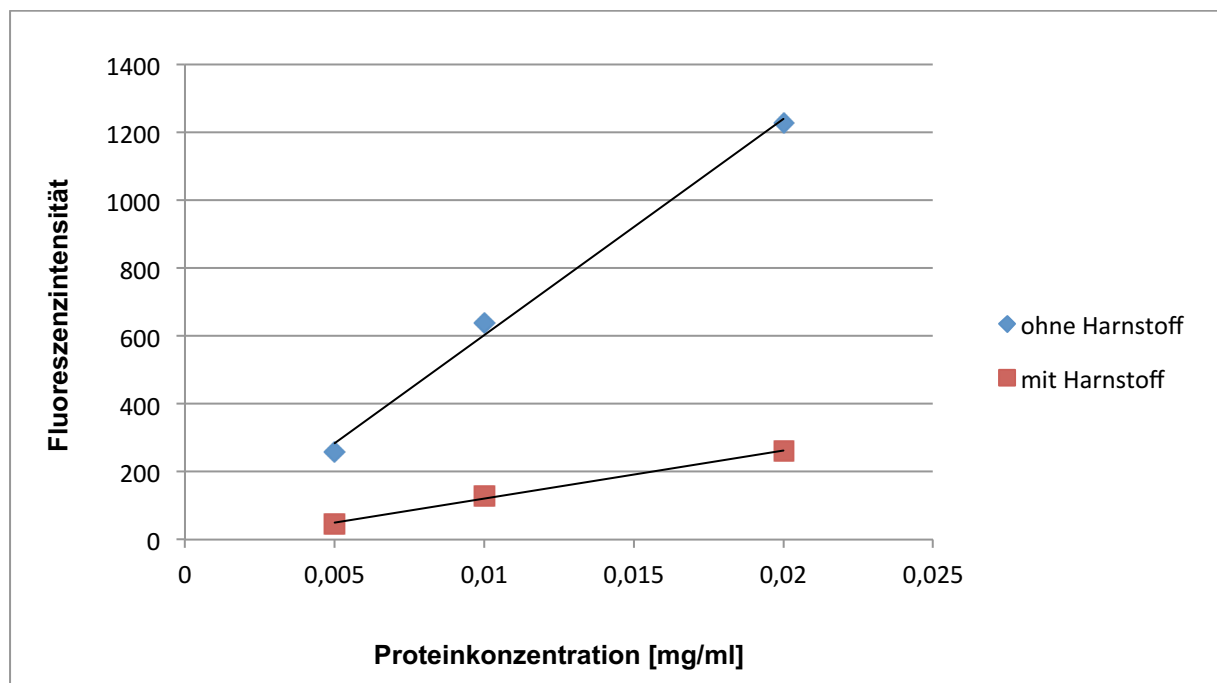


Abb. 42: Kalibrationsgeraden von R-Phycoerythrin in Puffer B und 0,02% Triton X-100 sowohl mit als auch ohne Zusatz von 5 M Harnstoff. Fluoreszenzmessung: 576 nm (Anregung 488 nm, Cut-off 550 nm).

6.1.7. Dialyse von Triton X-100 in Anwesenheit von R-Phycoerythrin

Die Dialyse von Triton X-100 aus Proben mit R-Phycoerythrin ist mit Harnstoff effizienter als ohne. Mit Harnstoff werden bei beiden untersuchten Temperaturen vergleichbare Raten erzielt (Abb. 43).

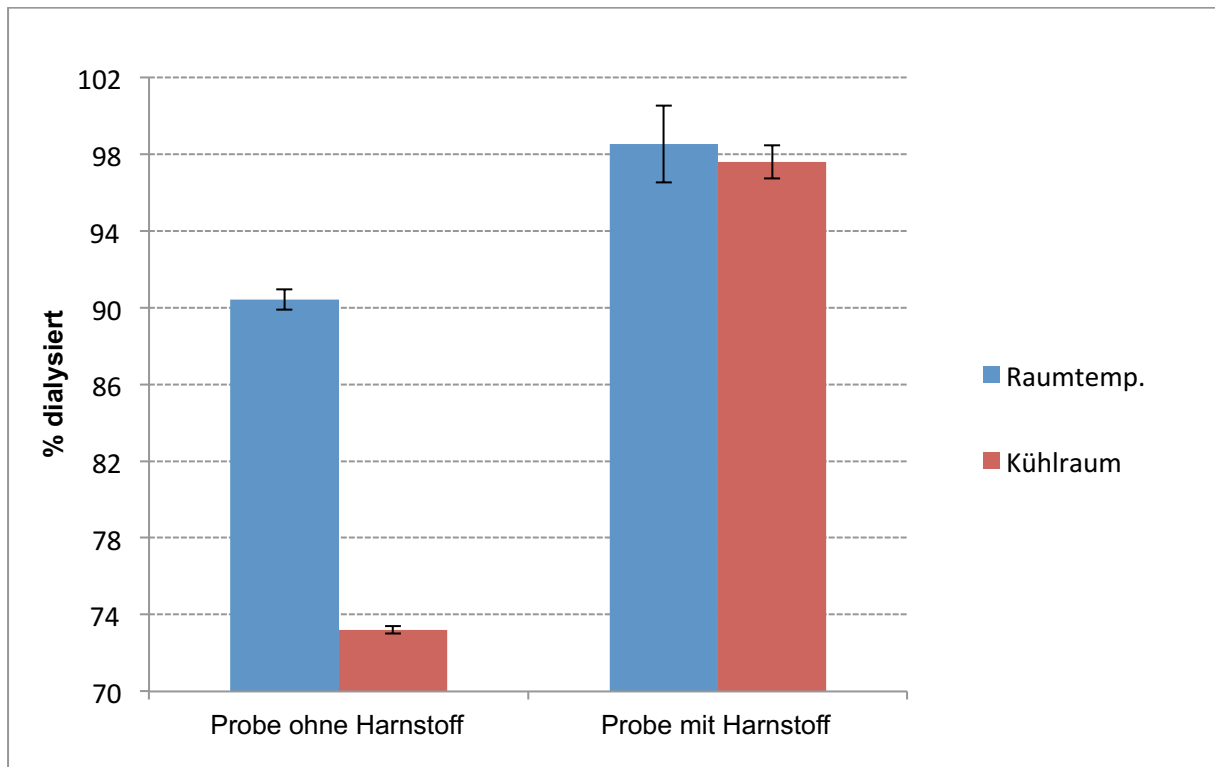


Abb. 43: Rate des mittels Dialyse entfernten Triton X-100 in Anwesenheit von R-Phycoerythrin und bei verschiedenen Temperaturen. Die Angaben in der Abbildung wurden entsprechend der Gleichung unter 6.1.3 Abb. 33-38 berechnet. 100 µl 0,5% Triton X-100 in Puffer B wurden sowohl ohne als auch mit 5 M Harnstoff für 72 Stunden bei verschiedenen Umgebungstemperaturen (Raumtemperatur: 23°C, Kühlraum: 8°C) unter Verwendung der MD-100 dialysiert, wobei das Wechselintervall 24 Stunden betrug. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregung von 488 nm und Emission von 576 nm, Cut-off von 550 nm.

Die mittels Fluoreszenz ermittelten Proteinwiederfindungen für R-Phycoerythrin lagen unabhängig von der Umgebungstemperatur bei den Proben ohne Zusatz von Harnstoff im Mittel (n=3) bei 110% und bei den Proben mit 5 M Harnstoff bei 81%.

6.2. Testung neu entwickelter Mikrodialysator-Prototypen

6.2.1. Proteinwiederfindung

Zunächst wurde die Proteinwiederfindung mit zwei Dialysatoren, ausgestattet mit im Innendurchmesser unterschiedlichen Dichtungselementen, wiederholt gemessen. Hierbei wurden in Vorversuchen mit dem größeren Innendurchmesser bei nahezu allen untersuchten Füllvolumina tendenziell kleinere Wiederfindungen ermittelt (Abb. 44). Aufgrund der stets besseren Ergebnisse wurden im Weiteren nur die Dichtungselemente mit dem kleineren Innendurchmesser (0,75 mm) verwendet. Damit wurde bei 500 µl Füllvolumen 98,4% Wiederfindung erreicht. Abb. 44 zeigt die Wiederfindung mit beiden Dichtungselementen Tools bei verschiedenen Füllvolumina.

Zum Vergleich: Aus den MD-100 wurden bei Verwendung von Einkanalpipetten im Mittel $93,1\% \pm 1,3\%$ der ursprünglichen Proteinmenge aus 100 µl und $91,3\% \pm 1,3\%$ bei der parallelisierten Bearbeitung mit einer 8-Kanalpipette wiedergewonnen.

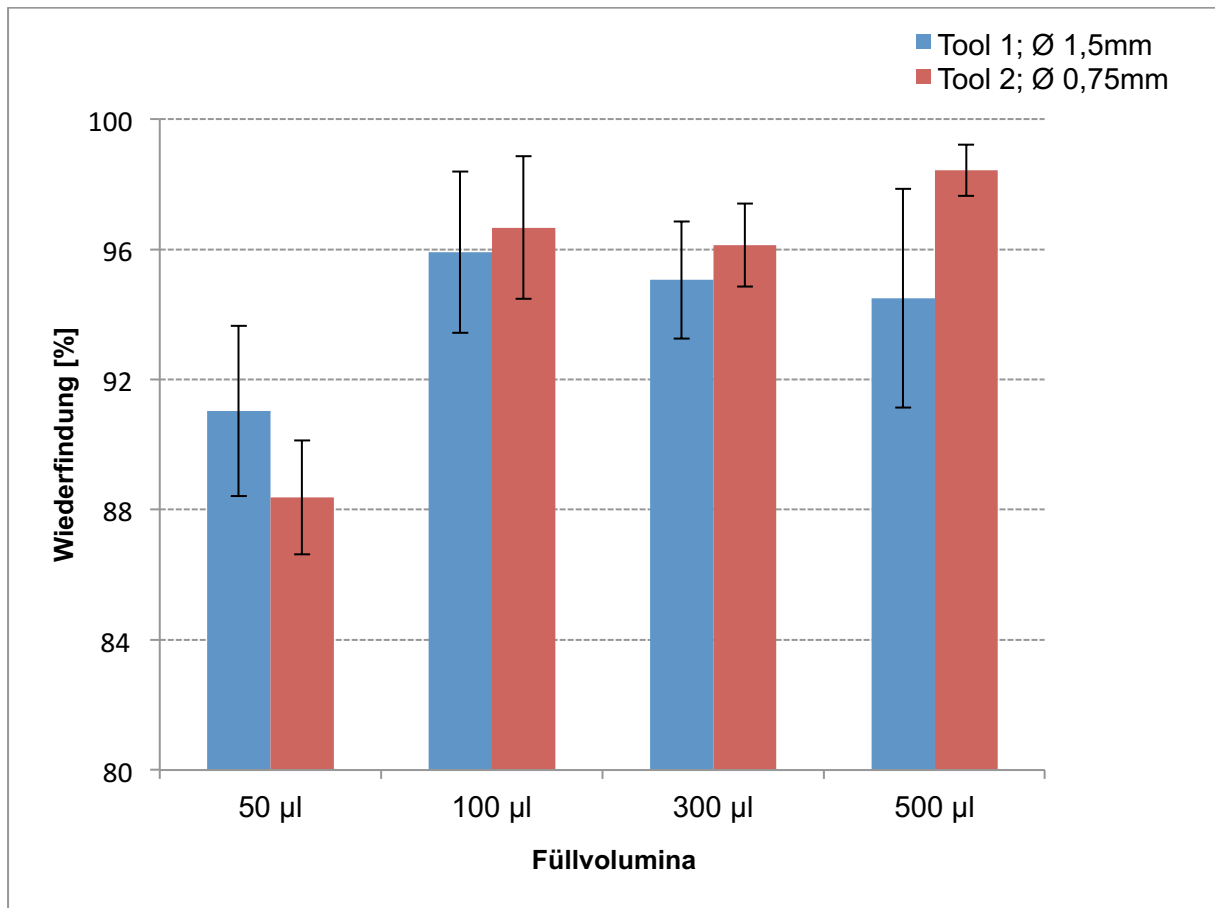


Abb. 44: Prozentuale Wiederfindung (Mittelwert \pm SD, $n=8$) von Cyanhämoglobin nach dem Entleeren mit Einkanalpipetten neuer Mikrodialysator-Prototypen. Testung von zwei verschiedenen Dichtungsgrößen und verschiedenen Füllvolumina. Für Füllvolumina von 50 µl und 100 µl wurden 200 µl-Pipettenspitzen (gelbe Spitzen) sowie für Füllvolumina von 300 µl und 500 µl 1000 µl-Pipettenspitzen (blaue Spitzen) verwendet. Quantifizierung wie unter Punkt 5.3.1. beschrieben.

Mit der unter 5.2.1. beschriebenen Methode des Nachspülens wurden bei 50 µl Füllvolumen nun Wiederfindungen von $98,9\% \pm 1,5\%$ erreicht. Dem stehen Wiederfindungen von $88,4\% \pm 1,8\%$ ohne Nachspülen gegenüber, jeweils bei Verwendung der neuen Mikrodialysator-Prototypen mit dem kleinen Innendurchmesser (0,75mm) der Dichtung.

Bei der Verwendung der 8-Kanalpipetten wurden Protein-Wiederfindungen im Mittel über alle 8 Kanäle von $86,4\% \pm 4,5\%$ bei 50 μl , $96,6\% \pm 1,4\%$ bei 100 μl und $98,8\% \pm 1,5\%$ bei 200 μl Füllvolumen erzielt. Obwohl die Restvolumina nicht identisch sind, wurde die Wiederfindung mit zunehmendem Füllvolumen größer.

6.2.2. Vergleich MD-100-neu entwickelte Mikrodialysator-Prototypen

Der Konzentrationsanstieg von p-Nitrophenol im Dialysat ist mit beiden Typen von Mikrodialysatoren zu jedem untersuchten Zeitpunkt nahezu gleich (Abb. 45). Die Halbwertszeit beträgt bei MD-100 21,9 min; bei den neuen Prototypen 22,2 min. Die Halbwertszeiten wurden aus den entsprechenden Kurvenabschnitten für „50% dialysiert“ errechnet.

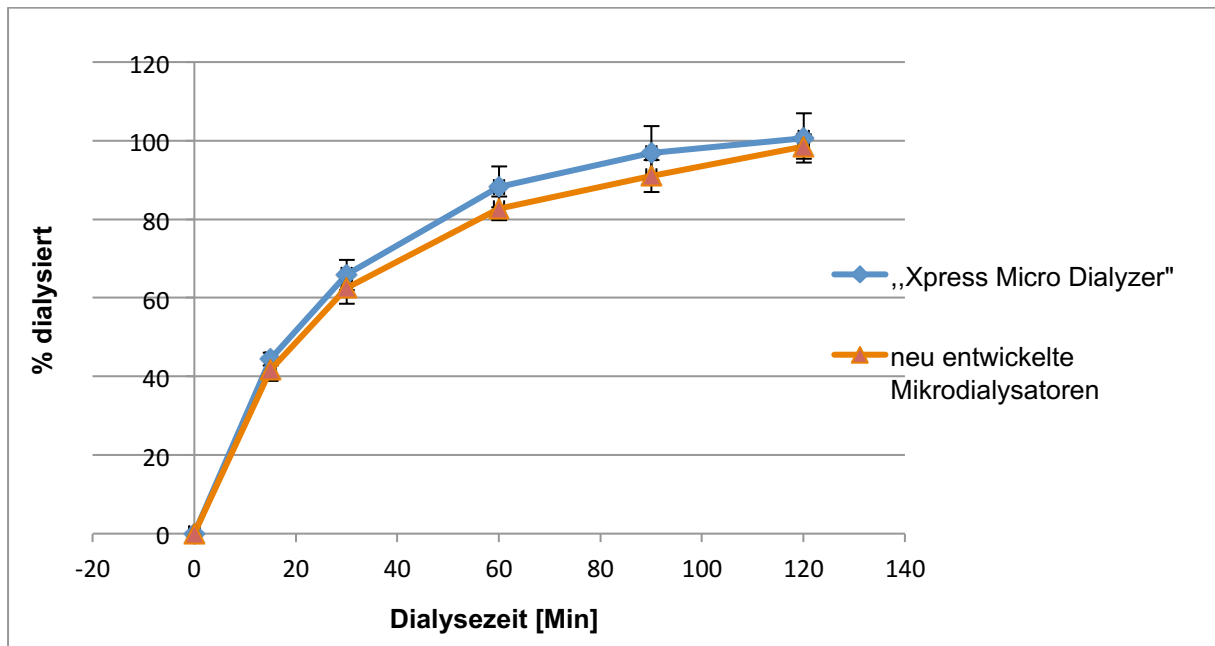


Abb. 45: Zeitverlauf des mittels Dialyse entfernten p-Nitrophenol (Mittelwert \pm SD, n=4) unter Verwendung der MD-100 und den neu entwickelten Mikro dialysator-Prototypen. Befüllung beider Arten von Mikro dialysatoren mit jeweils 100 μ l 5 mM p-Nitrophenol in Puffer C und Dialyse gegen 3 ml Puffer C. Entnahme von jeweils 50 μ l Dialysat nach 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten sowie Ausgleich der entnommenen Menge an Dialysat durch Zugabe von 50 μ l 100 mM TRIS. Anschließend erfolgte die Absorbanzmessung der gewonnenen Proben nach Verdünnen in Puffer D bei 405 nm und 700 nm. Diese Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

7. Diskussion

7.1. Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse

Mit dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob es möglich ist, die CMC von Triton X-100 zu erhöhen und ob eine Erhöhung der CMC durch geeignete Probenmatrix-Zusätze zu einer Konzentrationserhöhung an niedermolekularem Detergens und dadurch zu einer schnelleren Entfernung mittels Dialyse führen kann.

7.1.1 CMC-Erhöhung

Die von uns gemessene CMC von Triton X-100 in Puffer A betrug 0,014% und ist vergleichbar mit den Werten von Jumpertz (Jumpertz et al. 2011) und Ergebnissen, die mit anderen Verfahren erhoben wurden (Wollny 2010), (Stapf 2014), (Saïen and Asadabadi 2010) (0,015%). Dies zeigt die Zuverlässigkeit der verwendeten Messmethode.

Alle von uns untersuchten Lösungsmittel und chaotropen Verbindungen verändern bekanntermaßen die Wasserstruktur und damit die Interaktion der Detergensmoleküle mit Wasser und untereinander (Opitz et al. 2015, Huhn 2007, Laaksonen et al. 1997). Insbesondere Methanol, Ethanol, 2-Propanol und Guanidinhydrochlorid erhöhen konzentrationsabhängig die CMC von Triton X-100 deutlich. Dadurch kann auf eine höhere Konzentration von freien Monomeren geschlossen werden, die sich mittels Dialyse schneller entfernen lassen sollten. Es kann also erwartet werden, dass diese Additive die Dialyseeffizienz steigern.

Die höchste CMC von Triton X-100 von 0,5%, also eine Zunahme auf das 35-fache gegenüber rein wässrigen Lösungen, wird in Anwesenheit einer Kombination von 72% Methanol und 8% 2-Propanol erreicht. Alle anderen Additive zeigen einen etwas geringeren Einfluss auf die CMC. Da alle diese Zusätze nicht nur Einfluss auf die Detergensstruktur, sondern auch auf die Proteinstruktur haben und denaturierend wirken können, erfordert jede Anwendung ein Abwägen oder auch Prüfen der genauen Bedingungen eines Zusatzes in Abhängigkeit von der jeweiligen anvisierten

Downstream-Analysemethode. Zudem lässt sich die CMC aufgrund der Löslichkeit der meisten Additiva nicht unbegrenzt steigern. Die meisten der getesteten Kombinationen aus verschiedenen Additiva führten zu keinerlei überadditivem Effekt, verglichen mit dem der einzeln angewandten Substanzen, können aber im Hinblick auf die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen Alternativen sein.

7.1.2. Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse

Die meisten Additiva erhöhten nicht nur die CMC, sondern führten tatsächlich auch zu einer deutlichen Beschleunigung der Dialyse, wodurch eine praktisch vollständige Entfernung des Detergens in vergleichsweise kurzer Zeit möglich wird. Im Gegensatz dazu erhöht 2-Propanol zwar die CMC, hatte aber überraschend keinen Einfluss auf die Dialyse. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Erhöhung der CMC nicht zwangsläufig zu einer höheren Monomerkonzentration und damit Verbesserung der Dialyseeffizienz beiträgt. Unter bestimmten Bedingungen könnte es auch nur zu einer Verringerung der Aggregationszahl kommen, was zu einer größeren Mizellenkonzentration führen kann, die damit auch als scheinbar erhöhte CMC angezeigt wird (Buggert et al. 2006). Kurzkettige Alkane gelangen einfacher zwischen die Alkylketten des Tensids. Daraus resultieren stärker gekrümmte Grenzflächen und daraus wiederum kleinere Mizellen, die zu dichter gepackten Grenzschichten führen, in denen nur ein erschwerter Stoffaustausch zwischen den Mizellen möglich ist (García 2010). Und diese kleineren Mizellen könnten immer noch größer als der Cut-off der verwendeten Dialyse-Tools sein. Ebenso können sich in manchen Lösungsmitteln, besonders solchen mit länger-kettigen Alkanen, inverse Mizellen bilden (García 2010), bei denen sich die hydrophoben Anteile außen und die hydrophilen innen positionieren. Diese sind unter Umständen nicht mit Hoechst 33342 zu markieren.

Es ist aber auch eine Veränderung der Eigenschaften der hydrophilen Dialysemembran durch die hochkonzentrierten Additiva in Betracht zu ziehen.

Um dies abzuklären sind weiterführende Untersuchungen zur Partikelgröße und –struktur erforderlich, für die unser Institut keine Analysemöglichkeiten hat. In

wenigen beispielhaften Untersuchungen konnte lediglich gezeigt werden, dass einige Additive tatsächlich auch zu einer Verkleinerung der Mizellen führen können (Opitz et al. 2015).

7.1.3. Temperaturabhängigkeit der Dialyse

Die Temperatur hat bekanntermaßen Einfluss auf die Dynamik der Wassermoleküle und damit auch auf die CMC und die Diffusion, wie oben beschrieben (Jumpertz et al. 2011, Mehta et al. 2005). Je höher die Temperatur, desto größer die Brownsche Teilchenbewegung und demzufolge auch schneller der Stoffaustausch an Membranen. Daraus resultiert eine schnellere Dialyse.

Bei höheren Temperaturen ist die Dialysegeschwindigkeit natürlich größer und wäre ein Vorteil für den labortechnischen Einsatz. Dieser Vorteil kann in Life-science jedoch nicht uneingeschränkt genutzt werden, da Proteindenaturierung und Proteolyse ebenfalls beschleunigt würden. Außerdem ist dies in gemäßigten Breiten praktisch nur schwer umzusetzen. Neben dem erhöhten Platzbedarf ist die Eindämmung der Verdunstung der Lösungsmittel problematisch und müsste durch die Verwendung von geschlossenen Systemen umgangen werden. Desweiteren führt eine Temperaturerhöhung zur Denaturierung der in der Lösung enthaltenen Proteine. Infolgedessen aggregieren diese und fallen aus der Lösung aus (Hoppe und Schomburg 2002). Aus diesem Grund empfiehlt es sich, die Dialyse bei Raumtemperatur oder tieferen Temperaturen mit zwangsläufig höherem Zeitbedarf einzuplanen.

7.1.4. Dialyse von Triton X-100 mit R-Phycoerythrin

Die Entfernung von mehr als 98% von Triton X-100 aus einer proteinhaltigen Lösung ist für viele Downstream-Analysen ausreichend.

Die unzureichende Wiederfindung von R-Phycoerythrin nach Dialyse kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte das gering konzentrierte Protein

an der Dialysemembran adsorbieren. Andererseits könnten auch kleinste messtechnische Abweichungen sowohl durch die verringerte Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von Harnstoff als auch durch die veränderte Oberflächenspannung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Triton X-100 zu den Ergebnissen geführt haben. Die hier verwendete Fluoreszenzmessung zur Bestimmung des Proteingehaltes ist zwar eine sehr attraktive Methode, die keine zusätzlichen Reagenzien benötigt und gleichzeitig keinerlei Protein während des Bestimmungsvorgangs verbraucht. Die Fluoreszenzmessung in Mikrotiterplatten hat jedoch auch Nachteile. Die Messung ist vom Füllvolumen und der Oberflächenkrümmung abhängig (Lesley et al. 2002). Da Triton X-100 die Oberflächenspannung einer Lösung herabsetzt, sind Varianzen bei der Proteinbestimmung in Lösungen mit unterschiedlichen (und nach Dialyse unbekannten) Detergenskonzentrationen nicht auszuschließen.

7.2. MD-100

Die erreichten Protein-Wiederfindungen bei reiner Entladung von knapp über 90% sind für viele qualitative Anwendungen ausreichend. Die etwas geringere Wiederfindung mit der Multipipette ist den Toleranzen der Tools und der Pipettenspitzen zuzuschreiben. Hierbei gelingt es nur sehr schwer, mit allen acht Pipettenspitzen einen Verschluss zu gewährleisten.

Bei vielschrittigen Verfahren mit tausenden von Fraktionen, wie sie in der proteomischen Probenvorbehandlung vorkommen, sind allerdings Wiederfindungen nahe 100% und Variationskoeffizienten von 2% und besser notwendig.

7.3. Neu entwickelte Mikrodialysator-Prototypen

7.3.1. Wiederfindung aus neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen

Grundsätzlich ist die Probenwiederfindung aus den neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen durch den Einsatz von Dichtungsmaterialien und der zum Boden führenden Kapillare sowohl mit Einkanalpipetten als auch bei der Multipipette deutlich höher als mit MD-100 und sehr nahe 100%.

Die Abhängigkeit der Wiederfindung vom Füllvolumen ist zumindest anteilig dadurch zu erklären, dass ein etwa gleichbleibendes Restvolumen bei den höheren Füllvolumina einen kleineren relativen Anteil ausmacht. Das Restvolumen beträgt bei einem Füllvolumen von 100 µl unter Verwendung der Multipipette bei den neuen Mikrodialysator-Prototypen $3,4 \mu\text{l} \pm 1,4 \mu\text{l}$ sowie bei den MD-100 $8,6 \mu\text{l} \pm 1,2 \mu\text{l}$.

Durch einmaliges Nachspülen kann die Probe aus den Prototypen bei Verwendung der Einkanalpipetten praktisch vollständig zurückgewonnen werden. Für Einzelanwendungen ist das eine praktikable Möglichkeit, für Hochdurchsatzanwendungen ist ein solcher Schritt allerdings eine störanfällige Mehrarbeit.

Aus den Versuchen der Parallelisierung dieser Prototypen mittels Multipipette wurde offensichtlich, dass die Geometrien der Tools und der Dichtungen noch nicht optimal sind. Ich schlage vor, eine zweischichtige Gummidichtung zu verwenden. Diese sollte im Einstichbereich der Pipettenspitze konisch und aus einem relativ harten Gummimaterial gefertigt sein, damit die Pipettenspitzen ohne optische Kontrolle in die Öffnungen gleiten können. Der dem Tool zugewandte Teil der Dichtung sollte ebenfalls konisch, jedoch aus einem weicheren Gummimaterial bestehen, um sich den Umrissen der Pipettenspitzen besser anzupassen.

7.3.2. Vergleich von MD-100 und neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen

Die Dialysekinetiken von p-Nitrophenol aus den MD-100 und neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen sind unerwartet nahezu identisch, obwohl oben, bei größerer Schichtdicke, deutlich längere Zeiten zu erwarten wären. Das unerwartete

Ergebnis könnte auf einen konvektionsbedingten Gradientenausgleich innerhalb des Tools im Dialysezeitraum zurückzuführen sein kann. Die Protein-Wiederfindung ist bei den neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen, wie erwartet, deutlich besser.

8. Schlussfolgerungen

In der Arbeit wurde nachgewiesen, dass die CMC von Triton X-100 durch Zusatz geeigneter Lösungsmittel und chaotroper Stoffe, wie beispielsweise 2-Propanol, Ethanol, DMSO sowie Harnstoff stark erhöht werden kann. Durch die dadurch erreichten höheren Konzentrationen an diffusiblen Monomeren kann die Entfernung von Triton X-100 mittels Dialyse deutlich beschleunigt werden. Aus einem Satz prinzipiell möglicher Additiva und Randbedingungen können vom Anwender diejenigen ausgewählt werden, die mit den Stabilitätsanforderungen der Probenbestandteile, dem Zeitbedarf der Untersuchung und den analytischen Anforderungen der Downstream-Analysen kompatibel sind.

Die neu entwickelten Mikrodialysator-Prototypen sind für einen großen Volumenbereich geeignet, sind gut handtierbar, erlauben eine gute Proben- und Proteinwiederfindung und zeigen eine mit MD-100 vergleichbare Dialysegeschwindigkeit. Geometrie und Materialien des Dialysator- und des Dichtkörpers müssen nun an spritzgusstechnische Anforderungen angepasst und die Parallelisierbarkeit und Automatisierbarkeit der erhaltenen Produkte geprüft werden.

9. Literaturverzeichnis

Antharavally B S.

Mallia K A. Rosenblatt M M. Salunkhe A M. Rogers J C. Haney P.
Haghdoust N. 2011. Efficient removal of detergents from proteins and peptides in a spin column format. *Analytical Biochemistry*, 416.1: 39-44

Baumann I.

2014. Mizellen. Didaktik der Chemie [Folienserie]. Universität Bayreuth

Benrraou M

and Zana R. 2005. Effect of Alcohols on the cmc and Micelle Ionization Degree of Alkanediyl- α , ω -bis (Dimethyldodecylammonium Bromide) Surfactants. *Tenside Surfactants Detergents*, 42.3: 175-179

Bio-Rad Laboratories GmbH.

2015. Bio-Beads SM Hydrophobic and Polar Interaction Adsorbents Instruction Manual. Hercules. CA

Buggert M.

Mokrushina L. Smirnova I. Schomäcker R. Arlt W. 2006. Prediction of Equilibrium Partitioning of Nonpolar Organic Solutes in Water-Surfactant Systems by UNIFAC and COSMO-RS Models. *Chemical engineering & technology*, 29(5): 567-573

Canas B.

Piñeiro C. Calvo E. López-Ferrer D. Gallardo J. M. 2007. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*, 1153.1: 235-258

Carl Roth GmbH und Co KG.

2014. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006.
Versionsnummer 3. 9 physikalische und chemische Eigenschaften.
Karlsruhe

Cornelsen Schulbuchverlage GmbH.

2015. Formelsammlung. Berlin

Cotanda P.

Petzetakis N. O'Reilly R K. 2012. Catalytic polymeric nanoreactors:
more than a solid supported catalyst. MRS Communications, 2.04: 119-
126.

Fisher Scientific GmbH.

2015. Pierce BCA Protein Assay Reagent Kit Instructions. Schwerte

García P F.

2010. Extraktion mit inversen Mizellen an flüssig/flüssig Phasengrenzen
[Dissertation]. Universität München

Hoppe C

und Schomburg D. 2002. Entwicklung einer richtungs-und
abstandsabhängigen wissensbasierten Bewertungsfunktion für die
Vorhersage der Thermostabilität von Proteinen [Dissertation].
Universität Köln

Huhn C

2007. Optimierung von Probeninjektion und Trennung in der
Kapillarelektrophorese, der micellaren elektrokinetischen
Chromatographie und der Säulenkopplung Isotachophorese-
Kapillarelektrophorese zur Analyse komplexer Proben in der
forensischen Analytik [Dissertation] Universität Marburg

Jumpertz T.

Tschapek B. Infed N. Smits S H. Ernst R. Schmitt L. 2011. High-throughput evaluation of the critical micelle concentration of detergents. *Analytical biochemistry*, 408(1): 64-70

Laaksonen A.

Kusalik P. G. Svishchev I. M. 1997. Three-dimensional structure in water-methanol mixtures. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101(33): 5910-5918

Lesley S A.

Kuhn P. Godzik A. Deacon A M. Mathews I. Kreusch A. Vincent J. 2002. Structural genomics of the *Thermotoga maritima* proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99.18: 11664-11669

Lin S H

and Guidotti G. 2009. Purification of membrane proteins. *Methods in enzymology*, 463: 619-629

Łuczak J.

Hupka J. Thöming J. Jungnickel C. 2008. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 329(3): 125-133

Mehta S K.

Bhasin K K. Chauhan R. Dham S. 2005. Effect of temperature on critical micelle concentration and thermodynamic behavior of dodecyldimethylethylammonium bromide and dodecyltrimethylammonium chloride in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 255.1: 153-157

Opitz S.

Hannika F. Krüger T. Rhode H. 2014. The removal of Triton X-100 by dialysis is feasible! Analytical and bioanalytical chemistry, 1-12

Rabilloud T

and Lelong C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. Journal of proteomics, 74.10: 1829-1841

Rehm H

und Letzel T. 2009. Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics. Springer-Verlag

Saien J

and Asadabadi S. 2010. Adsorption and interfacial properties of individual and mixtures of cationic/nonionic surfactants in toluene+ water chemical systems. Journal of Chemical & Engineering Data, 55.9: 3817-3824

Scharnagl H.

Stojakovic T. März W. 2008. Biomarker in Forschung und Diagnostik. Biomarker, Schattauer-Verlag, 15

Schramm A.

Apostolov O. Sitek B. Pfeiffer K. Stühler K. Meyer M E. Havers W. Eggert A. 2003. Proteomics: Techniques and Applications in Cancer Research. Klinische Pädiatrie, Georg Thieme Verlag, 215.6: 293-297

Scienova GmbH.

2015. Jena

Seddon A M.

Curnow P. Booth P J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes, 1666.1: 105-117

Sigma-Aldrich International GmbH.

2015. St. Gallen

Sommerer N.

Centeno D. Rossignol M. 2007. Peptide mass fingerprinting. Plant Proteomics. Humana Press, 219-234

Stapf J.

2014. Bestimmung der dynamischen Oberflächenspannung mit Hilfe der Blasendruckmethode [Dissertation]. Universität Heidelberg

Suzuki Y

and Kabayama K. 2012. Convenient and rapid removal of detergent from glycolipids in detergent-resistant membrane microdomains. Journal of lipid research, 53.3: 599-608

Vogeser M.

2004. Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie in der klinischen Chemie/The use of HPLC-tandem mass spectrometry in clinical chemistry. LaboratoriumsMedizin, 28.3: 195-204

Wasinger V C.

Cordwell S J. Cerpa-Poljak A. Yan J X. Gooley A A. Wilkins M R. Humphery-Smith I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis, 16(1): 1090-1094

Wollny S.

2010. Experimentelle und numerische Untersuchungen zur Partikelbeanspruchung in gerührten (Bio-) Reaktoren [Dissertation]. Technische Universität Berlin

Yeung Y G.

Nieves E. Angeletti R H. Stanley E R. 2008. Removal of detergents from protein digests for mass spectrometry analysis. *Analytical biochemistry*, 382.2: 135-137

10. Anhang

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau PD Dr. Heidrun Rhode für die Bereitstellung meines Themas sowie für die ständige hilfreiche Unterstützung bei der Abfassung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Opitz für die Hilfeleistung bei der Planung und Auswertung der durchgeführten Versuche bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern sowie an meine Oma, die mich jederzeit hilfreich unterstützten und den Grundstein für meinen Weg gelegt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. Heidrun Rhode sowie Herr Dr. Stefan Opitz vom Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität Jena,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Battgendorf, den 17.06.2017
